

Kliinisten
 ^1H MR-spektroskopiatuskimuksien
yhdenmukaisuuden arviointi laitevalmistajien
välillä

Pro Gradu
Turun yliopisto
Fysiikan ja tähtitieteen laitos
Lääketieteellinen fysiikka
2020
LuK Jukka Ihalainen
Tarkastajat:
Prof. Petriina Paturi
FM Kalle Koskensalo

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck-järjestelmällä

TURUN YLIOPISTO

Fysiikan laitos

Ihalainen, Jukka Kliinisten ^1H MR-spektroskopiattutkimuksien yhdenmukaisuuden arviointi kahden laitevalmistajan välillä

Pro Gradu, 47 s., 0 liitettä.

Lääketieteellinen fysiikka

Syyskuu 2020

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

Ydinmagneettinen resonanssi [nuclear magnetic resonance, NMR] on atomin ytimen kvanttimekaaninen ominaisuus, jota hyödyntämällä voidaan tutkia mm. materiaan rakennetta, koostumusta, lämpötilaa ja molekyylien diffuusiota. Kiinnostuksen kohteesta saadaan tietoa, joko kvalitatiivisesti kuvan muodossa, tai kvantitatiivisesti konsentraatiospektrin avulla.

Jälkimmäistä ilmiötä tutkitaan magneettispektroskopian [magnetic resonance spectroscopy, MRS] avulla, joka voidaan suorittaa tavallisella sairaalan magneettikuvauslaitteella [magnetic resonance imaging, MRI], tai laboratorioolosuhteissa pienemmällä (ja tarkemmalla) magneettispektrometrillä. Tässä opinnäytetyössä tutkitaan MRI-laitteilla suoritettavaa protonimagneettispektroskopiaa (^1H MRS).

Protonilla on erinomaiset ominaisuudet käytettäväksi NMR-tutkimuksissa, koska sillä on alkuainesta suurin gyromagneettinen suhde γ ja vedyn isotoopeista suurin luonnollinen esiintyvyys, ollen siten *herkin* ydin spektroskopiattutkimuksiin. Herkkydellä tarkoitetaan NMR-ilmiölle välttämätöntä Zeemanin energitasojen miehityseroa, jotka opinnäytetyössä käydään tarkemmin läpi. Vaikka spektroskopiattutkimuksissa koko vetyatomi *protium* ^1H on tärkeä elektronin ja molekyyli sidosten tarkastelussa, puhutaan silti vain pelkän ytimen käsittävistä protoneista.

Opinnäytetyöhön kuuluu teoreettinen osuus, jossa tarkastellaan ydinmagneettisen resonanssin fysiikkaa ja siihen liittyvien mittaustekniikoiden kemiaa. Tämän jälkeen tulee empiirinen osuus, jossa tarkastellaan protonispektroskopiattutkimuksien toistettavuutta kahdella kuvantamislaitteella. Koe suoritetaan ihmisaivojen aineenvaihduntatuotteiden mittauksen avulla testikuvauskohteella, sekä erilaisten tunnettujen rasvojen relaksaatioaikojen mittauksen kautta. Toistettavuuden tutkiminen on tärkeää esimerkiksi tieteelliselle tutkimukselle, joka aloitetaan yhdellä laitteella ja joudutaan syystä tai toisesta saattamaan loppuun toisella.

Opinnäyte kirjoitettiin Turun valtakunnallisessa PET-keskuksessa, jossa vanha PET-MRI tuli käyttöikänsä päähän ja tilalle hankittiin uusi, eri valmistajan laite. Tieteellisten tutkimuksien ollessa vielä kesken, herää kysymys tutkimusten tulosten yhdenmukaisuuksista ja siirrettävyyksistä laitteiden kesken.

Asiasanat: ydinmagneettinen resonanssi, NMR, MRI, MRS, protonispektroskopia, rasvat, metaboliitit, voimalaskenta

Sisältö

Johdanto	1
1 Kirjallisuuskatsaus	3
1.1 NMR	3
1.1.1 Spin	3
1.1.2 Zeemanin ilmiö	8
1.1.3 Magnetisaatio, Larmorin taajuus ja signaalin syntyminen . . .	9
1.2 ^1H MRS	12
1.2.1 Spektri ja kemiallinen siirtymä	12
1.2.2 Relaksaatiomekanismit	16
1.3 Aiempi aiheeseen liittyvä tutkimus	18
1.4 Tutkimuksen tavoitteet	19
1.5 Tutkimuskohteet	20
1.5.1 Metaboliitit	20
1.5.2 Lipidit	23
2 Materiaalit ja menetelmät	25
2.1 MRI-kamerat ja kuvauskohteet	28
2.1.1 Philips Ingenuity TF PET/MR	29
2.1.2 GE Signa PET/MR	29
2.1.3 GE-Sphere MRS-aivofantomi	30
2.1.4 Rasvafantomi	30
2.2 Tilastollinen testaus	30
2.2.1 Hypoteesit	30
2.2.2 Testauksen virheet ja tutkimuksen voimakkuus	32
2.2.3 Keskiarvojen vertailu: kahden otoksen ekvivalenssitarkastelu .	33

3	Tulokset	35
4	Keskustelu	40

Johdanto

Kliiniset ja prekliiniset tutkimukset ovat lääketieteen kehityksen ja siten ihmiskunnan hyvinvoinnin kannalta tärkeä prosessi kohti menestyksekkäitä tuloksia. Tulokset voivat olla ymmärrys ihmisen fysiologiasta, ymmärrys käyttäytymismalleista tai sairauden uusi hoitomuoto. Tutkimukset tulee suorittaa tahdikkaasti, hyvää tutkimusetiikkaa noudattaen ja mahdollisimman vähäistä haittaa aiheuttaen.

Prekliinisiä tutkimuksia voidaan suorittaa koe-eläimille ja kokeissa noudatetaan vähimmän haitan periaatetta - 3R [reduce, refine, replace] *vähennä, kehitä, korvaa*. Tällä pyritään vähentämään kokeissa käytettävien eläinten lukumäärä, eli saattaa otoskoko mahdollisimman vähäiseksi.

Kliinisissä tutkimuksissa ihmisillä pätevät vähintäänkin yhtä tarkat arviointikriteerit ennen koejärjestelyn aloittamista. Tarvitaan eettisen lautakunnan puolto ja tutkimuslupa. Kaikkiin tutkimuksiin sisältyy pyrkimys mahdollisimman pieneen, mutta silti edustavaan otoskeroon tutkittavia valittaessa ja tutkimusmenetelmiä käytettäessä. Olisi eettisesti ja taloudellisesti väärin altistaa enemmän tutkittavia kokeille, kuin olisi merkityksen kannalta tarpeellista. Tosin liian pienen otoskoon valinta ja tutkimuksille altistaminen turhaan olisi myös epäeettistä perusjoukon estimaatin tarkkuuden kärsiessä ja tilastollisen mallin ollessa epätarkka.

Tutkimuksen suunnitteluun ja aineistokoon määrittämiseen on tilastollisia työkaluja, joista tässä opinnäytetyössä käytetään tutkimuksen voimakkuutta. Voima-analyysilla määritetään tarvittava otoskoko, koska nykyaikaisten ja tehokkaiden tutkimusten otoskoot ovat oltava tarpeellisen suuria, antaen riittävän kuvan perusjoukosta.

Tärkeänä osana lääketieteellisiä tutkimuksia ovat kuvantamislaitteet, joista tässä opinnäytteessä käsitellään magneettikuvauslaitteita ja niillä suoritettavia spektroskopia tutkimuksia *in vivo*. Magneettikuvauslaitteet itsessään eivät aiheuta tutkittaville terveydellistä haittaa, mutta tutkimuksiin sisältyy usein muita haittatekijöitä

joille altistumista halutaan minimoida. Näitä voivat olla varjoaineiden, tai muiden fysiologiaan vaikuttavien lääkeaineiden käyttäminen, puhumattakaan vapaudenmenetyksestä tutkimuksien aikana.

Magneettikuvantaminen on myös kallista ja verrattain hidasta, joten on tärkeää, että datan otoskoko pysyy tehokkaana. Tämän opinnäytetyön mittausten ja muutettujen parametrien avulla määritetään optimaalinen määrä kuvaussarjoja, jolla saadaan tilastollisesti vertailukelpoiset mittatulokset kahden laitteen kesken.

Turussa sijaitsevan valtakunnallisesti palvelevan PET-keskuksen Philipsin valmistama PET-MRI tuli käyttöikänsä päähän ja sairaala teki päätöksen vaihtaa uuden laitteen myötä myös valmistajaa. Vanhalla laitteella oli kuitenkin vielä klinisiä tutkimuksia kesken ja tiedeyhteisölle onkin epäselvää tutkimusten siirrettävyyksistä laitteiden välillä.

Siirrettävyyttä ja laitteiden välistä suorituskykyä on tutkittu aikaisemmin spektroskopiatasolla [1], sekä tarkemmin tilastollisin menetelmin [2]. Tämä opinnäytetyö ei pelkästään tutki laitteiden keskinäistä tarkkuutta, mutta vertailee absoluuttisia mittaustuloksia useilla mittaussarjoilla näiden välillä ja ohjeistaa, mitä tutkimusten siirrossa laitteelta toiselle tulisi huomioida.

Opinnäytetyö johdattaa lukijan teoriatasolta käytännön mittauksiin ja tulosten analysointiin. Kirjallisuuskatsauksessa käydään läpi NMR-ilmion fysiikkaa ja mittausten menetelmien tekniikkaa. Myös mittauskohteet ja kamerat esitellään, jonka jälkeen analysoidaan ja vertaillaan tuloksia kameroiden välillä. Lopuksi esitetään suositukset ja tarvittavat toimenpiteet mittausten siirrettävyyksille.

Taulukko 1. NMR-tutkimuksissa yleisesti käytetyt ytimet

Ydin	Spin	Gyromagneettinen suhde, γ [MHz/T]	Larmor- taajuus, ω (3 T) [MHz]	Isotoopin esiintyvyys [%]	Herkkyys [$^1\text{H} = 1$]
^1H	1/2	42,58	127,74	99,985	1
^3He	1/2	-32,43	97,29	0,0001	$5,75 \times 10^{-7}$
^{13}C	1/2	10,71	32,13	1,108	$1,76 \times 10^{-4}$
^{19}F	1/2	40,05	120,15	100	0,834
^{23}Na	3/2	11,26	33,78	100	$9,27 \times 10^{-2}$
^{31}P	1/2	17,24	51,72	100	$6,65 \times 10^{-2}$
e^-	1/2	-27204	$81,6 \times 10^3$	-	-

1 Kirjallisuuskatsaus

1.1 NMR

1.1.1 Spin

Ydinmagneettinen resonanssi perustuu kappaleen luontaiseen kvanttimekaaniseen ominaisuuteen, spiniin. Kappaleella tarkoitetaan tässä yhteydessä alkeishiukkasia ja kvarkkien yhdistelmiä: hadroneita ja atomiytimiä. Yksinkertaistettuna mekaanisesta näkökulmasta kappaleen spiniä magneettikentässä voidaan ajatella hyrränä, jolle alkuvauhti pyöräytetään *vinoon*, eli pyörimisakseli ei ole yhdensuuntainen putouskiihtyvyyteen nähden, joten hyrrän pyörimisakseli alkaa kiertyä gravitaatiovektorin ympäri.

Vastaava ilmiö esiintyy myös kvanttimekaniikassa, jossa hyrrän pyörimisakselin korvaa kappaleen magneettisen dipolimomentin μ aikaansaama symmetrinen magneettikenttä¹ ja vastaavasti gravitaatiokentän korvaa voimakas, homogeeninen ja isotrooppinen magneettikenttä B_0 .

Kiertymistä magneettikentän, tai gravitaatiokentän suunnan ympäri kutsutaan

¹Kuten kompassin neula pyrkiessään kääntymään ulkoisen magneettikentän suuntaisesti. Siinä etelä- ja pohjoisnapa tuottavat magneettisen momentin, jonka voi piirtää neulan pituusakselin suhteen yhdensuuntaisena vektorina.

prekessioksi ja sen aikamuutosta, eli vauhtia, eli kulmataajuutta kutsutaan kappaaleelle ominaiseksi Larmorin taajuudeksi ω_L [Taulukko 1]. Jos pyörivää hyrrää poikkeuttaa, kuten sormellaan tökkäämällä, hyrrä horjahtaa lattiaa, eli (x, y) -tasoa kohti ja prekessoi suuremmalla säteellä palautuen hiljalleen takaisin alkuperäiseen asentoonsa; hyrrä relaksoituu poikkeustilastaan. NMR perustuu juurikin spinillisen kappaaleen poikkeuttamiseen, mutta sormen sijaan atomiydintä poikkeutetaan Larmorin taajuuksisella sähkömagneettisella kentällä B_1 . Aika, joka kappaaleella kestää palautua alkuperäisen asennon suuntaan on relaksaatioaika, jonka aikana voidaan lukea signaali. Tästä enemmän luvussa 1.1.3.

Yksinkertaistettuna relaksaatioaika jaetaan kahteen osaan; magnetisaatiovektorin ja B_0 suuntainen komponentti T_1 ja kohtisuoraan B_0 vastaan oleva komponentti T_2 . Kiintoisaa on, että spin *ei ole* minkäänlaista avaruudellista pyörivää liikettä, vaikka sillä onkin kiertoliikemäärä ja "suunta" ja sitä voi tiettyyn pisteeseen mallintaakin hyrrän liikkeenä. Spinin käsite on kokonaisuudessaan hankala ja matemaattinen, joten käydään vielä klassisen mekaniikan ja kvanttimekaniikan yhteydet kulmaliikemäärään ja Larmorin taajuuteen.

Määritellään aluksi kappaaleen massakeskipisteen kiertoliikemäärä \mathbf{L} klassisessa mekaniikassa

$$\mathbf{L} = \mathbf{r} \times \mathbf{p}, \quad (1)$$

jossa \mathbf{r} on kappaaleen massakeskipisteen kiertosäde kiinteän keskipisteen ympäri ja \mathbf{p} on suoraviivaisen liikkeen liikemäärä

$$\mathbf{p} = m\mathbf{v} = \int \mathbf{F}dt, \quad (2)$$

jossa m on kappaaleen massa, \mathbf{v} on kappaaleen nopeus, \mathbf{F} on kappaaleeseen vaikuttava voima ja t on aika. Voiman momentti \mathbf{T} määritellään, kun voima muuttaa kulma-

liikemäärää ajassa t ja etäisyydellä \mathbf{r}

$$\mathbf{T} = \mathbf{r} \times \mathbf{F} = \mathbf{r} \times \left(\frac{d\mathbf{p}}{dt} \right). \quad (3)$$

Sähkö- ja magnetismiopista tiedetään, että vakionopeudella ja vakioetäisyydellä ympyrän keskipisteen suhteen liikkuva varaus q aiheuttaa ympärilleen symmetrisen magneettikentän, jota voidaan kuvata magneettisen momentin vektorilla $\boldsymbol{\mu}$

$$\boldsymbol{\mu} = \mathbf{I} \int \mathbf{A} \quad (4)$$

$$= q \frac{\mathbf{v}}{2\pi\mathbf{r}} \pi \mathbf{r}^2 \quad (5)$$

$$= q\mathbf{v}\mathbf{r}/2, \quad (6)$$

jossa \mathbf{v} on varatun hiukkasen nopeus, \mathbf{I} on sähkövirta ja \mathbf{r} on etäisyys keskipisteestä.

Yhdistämällä yhtälöt (1) ja (2)

$$\mathbf{L} = \mathbf{r} \times m\mathbf{v} \quad (7)$$

yhtälöön (6), saadaan klassiselle magneettiselle momentille uusi yhtälö

$$\boldsymbol{\mu} = \frac{q}{2m} \mathbf{L}, \quad (8)$$

josta saadaan gyromagneettinen suhde γ

$$\gamma = \frac{q}{2m}. \quad (9)$$

Näin magneettiselle momentille ja kiertoliikemäärän välille saadaan yhtälö

$$\boldsymbol{\mu} = -\gamma \mathbf{L}. \quad (10)$$

Kvanttimekaniikassa kappaleen kokonaiskiirtoliikemääräoperaattorin \hat{J} määrittelee puolestaan kaksi operaattoria, jotka ovat summa kappaleen ominaisesta spin-operaattorista \hat{S} ja impulssimomenttioperaattorista \hat{L} yhtälöllä

$$\hat{J} = \hat{L} + \hat{S}. \quad (11)$$

Yksinkertaistamisen vuoksi tarkastellaan protonia, jonka spinkvanttiluku $s = 1/2$, ja jätetään elektronin ja ytimen *LS-kytkentä* huomiotta, joten kokonaiskiirtoliikemääräoperaattorille saadaan amplitudi (voimakkuus)

$$J = S = \hbar[s(s+1)]^{1/2}. \quad (12)$$

Oikeanpuoleisessa yhtälössä on spinoperaattorin komponentit, $s = 1/2$ ja \hbar , joka on redusoitu Planckin vakio. Yhtälön (10) mukaan magneettinen momentti on nyt muodossa

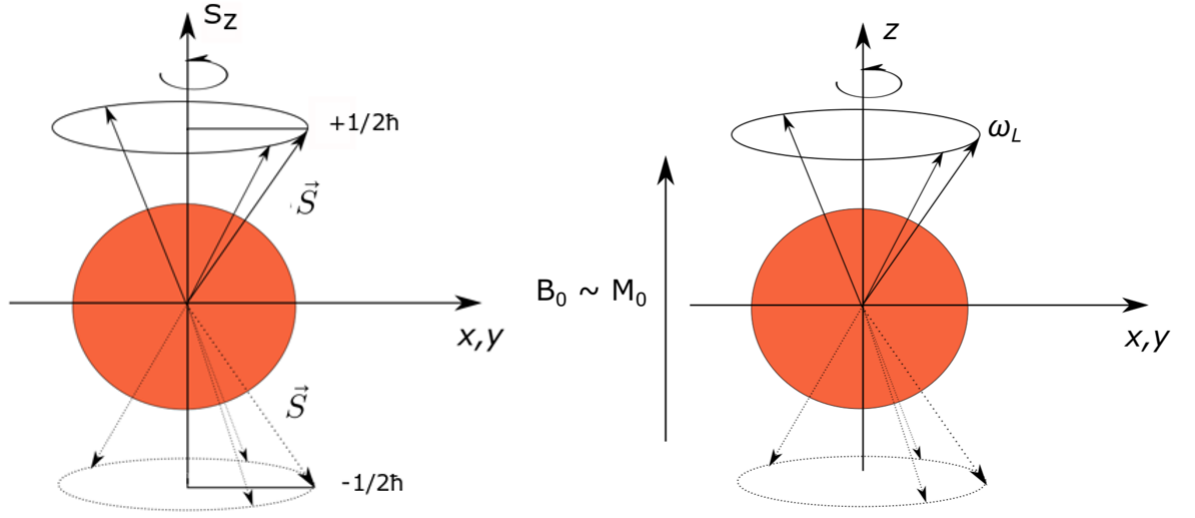
$$\boldsymbol{\mu} = -\gamma\hat{S}. \quad (13)$$

Tiedetään myös, että magneettisen momentin potentiaalienergia E , ulkoisen magneettikentän z -pystyakselin suhteen on

$$E = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B}_0 = -B_0\gamma\hat{S}_z. \quad (14)$$

Esitellään uusi operaattori, Hamiltonin operaattori \hat{H} , joka operoi kappaleen paikan funktioon, eli aaltofunktioon Ψ . Koska tarkastelun kohteena on vain energiatiloja E , näistä muodostetaan ajasta riippumaton Schrödingerin yhtälö.

$$\hat{H} |\Psi\rangle = E |\Psi\rangle. \quad (15)$$



Kuva 1. Vasemmalla protonin mahdolliset energiatilat, joita kuvaa spin-vektorin \vec{S} suunta ja sen amplitudi $|\vec{S}| = \hbar\sqrt{s(s+1)} = \hbar\frac{\sqrt{3}}{2}$ ja sen $S_z = \pm\hbar/2$ suuntaiset projektiot. Oikealla protonin larmorprekessio pituusakselinsa ympäri, kun ulkoinen magneettikenttä \mathbf{B}_0 on kytketty. Spin $+1/2$ tilassa magnetisaatiovektori \mathbf{M}_0 osoittaa myös ulkoisen magneettikentän suuntaisesti.

Spin-operaattorin z -suuntainen projektio voi saada vain $+(1/2)\hbar$ tai $-(1/2)\hbar$ arvoja (Kuva 1), joten yhdistämällä yhtälöt (13, 14) yhtälöön (15), saadaan kummallekin spinille yhtälöt

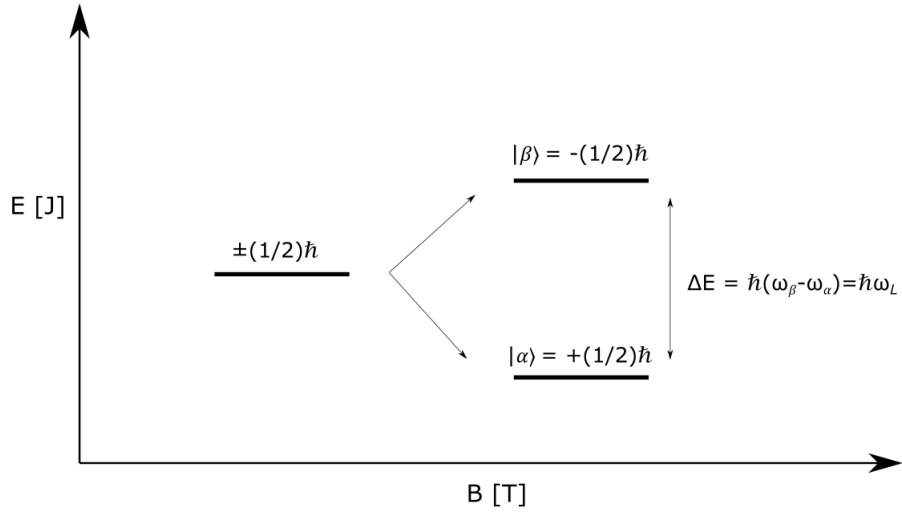
$$\hat{H}\Psi_{\pm 1/2} = \pm \frac{1}{2}\hbar\gamma B_0\Psi_{\pm 1/2}. \quad (16)$$

Jos tarkastellaan vielä spinien tilojen energioiden erotusta $\Delta E_{\pm 1/2}$ protonin tapauksessa (Kuva 2)

$$E_{1/2} - E_{-1/2} = \frac{1}{2}\hbar\gamma B_0 - \left(-\frac{1}{2}\hbar\gamma B_0\right) \quad (17)$$

$$\Rightarrow \gamma B_0 = \omega_L, \quad (18)$$

saadaan kulmanopeus ω_L , joka osoittautuu taulukon 1 mukaiseksi ytimille ominaiseksi Larmorin taajuudeksi [3].



Kuva 2. Zeemanin ilmiö, jossa degeneroitunut stabiili tila muuttuu ulkoisen magneettikentän johdosta kahdeksi energiatasoksi. $-(1/2)\hbar$ kuvaa päinvastaista magnetisaatiota ulkoisen magneettikentän suhteen ja siten on korkeamman energian tila.

1.1.2 Zeemanin ilmiö

Atomin virittymiseen korkeammalle energiatasolle E_m alemmalta tasolta E_n tarvitaan aina diskreetti määrä fotonin energiaa $\hbar\omega_{viritys} = E_m - E_n$, joka absorptoituu ja sitten vapautuu. Zeemanin ilmiössä [4] ulkoinen magneettikenttä B_0 rikkoo atomin sähköisen tilan pallosymmetrian ja eri sähköisten konfiguraatioiden samanarvoiset degeneroituneet energiatilat saavat eri suuruuden (Kuva 2).

Zeemanin energiatasojen määrä riippuu ytimen spin-luvusta

$$E_n = (2S + 1) \quad (19)$$

$$= (2 \cdot 1/2) + 1 = 2. \quad (20)$$

Yhtälössä (20) on esimerkkinä protonin spin $1/2$. Perustason jakautumisessa kahdeksi tarkoittaa kokonaismagnetisaation pysyvän samansuuntaisena kuin ulkoinen magneettikenttä, mutta magneettikenttään varastoituu potentiaalienergiaa, kun osa protonipopulaation spineistä "virittyy" magneettikentän suhteen päinvastaiseen suun-

taan. Erisuuntaisten spinien suhde esimerkiksi 3 T:n ulkoisessa magneettikentässä on kuitenkin lähes sama, noudattaen Boltzmannin jakaumaa

$$\frac{S_{\uparrow}}{S_{\downarrow}} = e^{-\Delta E/kT} \quad (21)$$

$$= e^{-\hbar\omega_L/kT} \quad (22)$$

$$= 0,9999997, \quad (23)$$

jossa E on Zeemanin tasojen välinen energia, k on Boltzmannin vakio ja T on lämpötila kelvineinä.

Yllä oleva tulos kertoo, että jokaista miljardia $+1/2\hbar$ spin-tilaa kohden on vain 300 kpl vähemmän $-1/2\hbar$ spin-tiloja. Ottaen huomioon, että NMR-signaali riippuu vain spin-tilojen erotuksesta, tekniikka on erittäin herkkä häiriöille [5]. Signaalia voi parantaa yhtälön (21) mukaan suurentamalla energiaväliä, eli larmor-taajuutta (Kuva 2) kasvattamalla kentänvoimakkuutta B_0 . Lämpötilan alentaminen merkittävästi ei ole vaihtoehto eläviä kohteita kuvatessa.

1.1.3 Magnetisaatio, Larmorin taajuus ja signaalin syntyminen

Aikaisemmissa luvuissa on käyty läpi materiaalille luontaisia ominaisuuksia NMR-ilmiön aikaansaamiseksi. Seuraavissa luvuissa esitellään kuinka materiaalia "luetaan", eli kuinka Larmor-taajuus liittyy sähkömagneettisen kentän energian varastoitumiseen ja vapautumiseen ja siten resonanssisignaalin syntymiseen.

1938 yhdysvaltalainen *Isidor Rabi* huomasi kokeissaan [6] kuinka litiumkloridimolekyylisuihku absorboi päämagneettikentän energiaa tyhjiössä tietyllä kentänvoimakkuudella. Rabi kutsui ilmiötä ydinmagneettiseksi resonanssiksi (Nobel 1944) [7].

1945 yhdysvaltalaiset *Felix Bloch* ja *Edward Purcell* tutkimusryhmineen esittivät ydinmagneettisen resonanssin kiinteillä aineilla ja normaali-ilmakehässä eri ilmiöiden kautta [8]. Bloch protonin resonanssisignaalin kautta ja Purcell vastaavasti

protoniytimen absorboidessa Larmorin taajuuksisen ulkoisen magneettikentän \mathbf{B}_1 energiaa. Blochin lähestymistapaa voisi pitää klassisena ja Purcellin kvanttimekaanisena lähestymistapana ilmiöön (jaettu Nobel 1952) [9].

Yhtälö (18) osoitti, että kahden Zeemanin energiatason erotuksesta saadaan ytimelle ominainen Larmorin taajuus, jolla ydin prekessoi ulkoisen magneettikentän \mathbf{B}_0 suuntaisesti. Kun ydintä poikkeuttaa pituusakselia kohtisuoraan olevalla sähkömagneettisella kentällä, ytimen magneettinen momentti alkaa prekessoimaan sekä z -akselin suuntaisen ulkoisen \mathbf{B}_0 -kentän, että (x,y) -tason suuntaisen poikeuttavan \mathbf{B}_1 -kentän ympäri.

Mitattavaa aluetta pitää kuitenkin tarkastella kokonaisuutena, eli kaikkien protonien spinien aiheuttamien magneettisten momenttien summana. Esitellään magnetisaatio \mathbf{M}_0 , jolla viitataan ns. kokonaismagnetoitumaan, eli useiden protoniytimien spinien ja näiden keskinäisten vaihe-erojen ja orientaatioiden aiheuttamaan kokonaismagnetisaatiovektoriin \mathbf{M}_0 . Staattisessa tilanteessa \mathbf{M}_0 on yhdensuuntainen ulkoisen magneettikentän \mathbf{B}_0 kanssa yhtälön (24) mukaisesti.

Tarkastellaan magnetoitumaa Blochin yhtälöillä staattisessa magneettikentässä \mathbf{B}_0

$$\frac{d}{dt}\mathbf{M}_0 = \gamma(\mathbf{M} \times \mathbf{B}_0) \quad (24)$$

$$\frac{d}{dt}\mathbf{M}_0 = \begin{bmatrix} \gamma M_y(t) B_0 \\ -\gamma M_x(t) B_0 \\ 0 \end{bmatrix}, \quad (25)$$

josta nähdään, että magnetisaation z -suuntainen komponentti on riippumaton ajasta, eli on vakio. Tämä kuvastaa tilannetta ennen poikkeuttavaa radiotaajuisia sähkömagneettista kenttää \mathbf{B}_1 , eli RF-pulssia (Kuva 1 oik.). Tämän Larmor-taajuuksisen

pulssin aikana saadaan kokonaismagnetisaation aikamuutokselle yhtälöt

$$\frac{d}{dt}\mathbf{M}_0 = \gamma(\mathbf{M} \times [\mathbf{B}_0 + \mathbf{B}_1]) = \begin{bmatrix} \gamma M_y(t)B_0 - M_z(t)B_{1y} \\ \gamma M_z(t)B_{1x} - M_x(t)B_0 \\ \gamma M_x(t)B_{1y} - M_y(t)B_{1x} \end{bmatrix}. \quad (26)$$

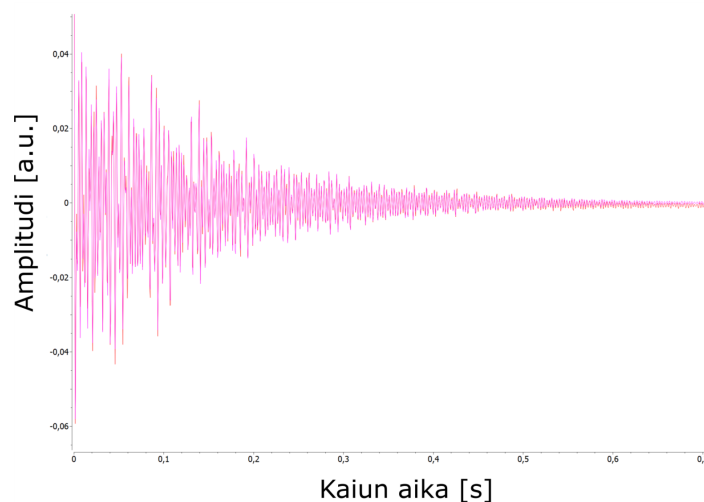
Pulssin \mathbf{B}_1 jälkeen seuraa kokonaismagnetisaation \mathbf{M}_0 palautuminen ulkoisen magneettikentän \mathbf{B}_0 suuntaisesti

$$\mathbf{M}_0 = \begin{bmatrix} M_0 \cos \sim e^{-t/T_2} \\ M_0 \sin \sim e^{-t/T_2} \\ M_0(1 - e^{-t/T_1}) \end{bmatrix} \Rightarrow \mathbf{M}_0 \approx \mathbf{B}_0. \quad (27)$$

Yhtälö (26) osoittaa, että nyt kokonaismagnetisaatio on muuttuu kaikkien komponenttien osalta. Yhtälö (27) kuvaa magnetisaation muutosta B_1 kentän poistumisen jälkeen, jolloin (x, y) -tason magnetisaatio lähestyy eksponentiaalisesti nollaa riippuen T_2 aikaparametrasta ja z -suuntainen magnetisaatio palautuu eksponentiaalisesti magneettikentän \mathbf{B}_0 mukaiseksi riippuen T_1 -parametrasta. Tätä kutsutaan *relaksoitumiseksi*.

Jotta kokonaismagnetisaatio \mathbf{M}_0 saataisiin käännettyä hetkeksi x, y -tasolle, josta se palautuu takaisin z -suuntaiseksi, tarvitaan RF-pulssi \mathbf{B}_1 . Tämä kohtisuoraan \mathbf{B}_0 -kenttää oleva Larmor-taajuuksinen pulssi saa osan spin-populaatiosta prekessoimaan pulssin pituusakselia ympäri x , tai y -akselia ja koherentissa vaiheessa. Koska spinin ja siten magneettiset momentit ovat järjestäytyneet samaan vaiheeseen eivätkä kumoa toisiaan, kokonaismagnetisaatiovektori \mathbf{M}_0 osoittaaakin nyt (x, y) -tasolle.

NMR-ilmiö syntyy, kun x , tai y -akselia prekessoivat protonien spinin synnyttävät sähkömotorisen voiman [electromotive force - emf] (x, y) -tasossa olevaan vastaanotinkelaan. Emf:n aikaansaama lähdejännitettä ja sen eksponentiaalista vaimenemista T_2 aikaparametrin mukaan sanotaan FID-signaaliksi [free induction decay] ja



Kuva 3. Free Induction Decay, eli FID-signaali kuvaa x,y -tason suuntaisesti vastaanotinkelaan indusoituneen jännitteen eksponentiaalisen vaimenemisen T_2 -relaksaation aikana. Kuvan signaali on mitattu 1 cm^3 kokoisen vokselin alueelta aivofantomista ja koostuu eri taajuuksisista komponenteista, joista Fouriermuunnoksella saadaan taajuussiirtymäspektri ja siten eroteltua eri molekyyliryhmät [Kuva 5].

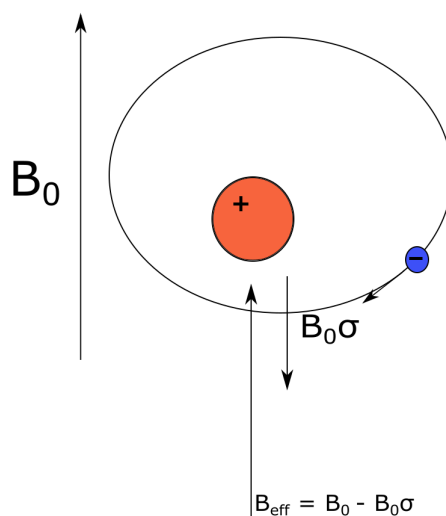
ydinmagneettiseksi resonanssiksi (Kuva 3).

1.2 ^1H MRS

1.2.1 Spektri ja kemiallinen siirtymä

Yhtälö (18) määrittelee ytimille ominaisen prekessiokulmanopeuden, mutta todellisessa ympäristössä ulkoinen magneettikenttä ei koskaan ole täydellisen homogeeninen. Ampèren lain mukaan liikkeessä oleva varaus synnyttää ympärilleen magneettikentän ja siten protonien ja molekyylien ympärillä olevat elektronit aiheuttavat myös magneettikentän, joka on Lenzin lain mukaan vastakkaissuuntainen \mathbf{B}_0 —kenttään nähden (Kuva 4). [10]

Tämä vastakkainen magneettikenttä luo molekyyleille ominaisen paikallisen kemiallisen ympäristön varjostamalla sidoksiin osallistuvien protoneiden magneettista momenttia ja on pohjana NMR-tekniikalle. Tarkastellaan kokonaismagneettikenttää



Kuva 4. Elektronipilvi ytimen ympärillä luo vastakkaissuuntaisen magneettikentän $-B_0\sigma$, joka vähentää ytimen kokemaa magneettikenttää ja siten pienentää Larmortaajuutta. Tätä kutsutaan kemialliseksi siirtymäksi.

\mathbf{B}_{eff} , jonka protoni kokee

$$\mathbf{B}_{\text{eff}} = \mathbf{B}_0 - \mathbf{B}_0\sigma = \mathbf{B}_0(1 - \sigma), \quad (28)$$

jossa σ on varjostusvakiotensori, jolle pätee aina $||\sigma|| < 1$. Yhtälöstä (28) seuraa, että elektronitiheys muuttaa (hidastaa) protonien larmortaajuutta referenssitaajuudesta yhtälöllä (huom. $\nu = \omega/2\pi$)

$$\nu_{\text{paikallinen}} = \gamma \mathbf{B}_{\text{eff}}/2\pi = \gamma \mathbf{B}_0(1 - \sigma)/2\pi, \quad (29)$$

jossa

$$\frac{\gamma \mathbf{B}_0}{2\pi} = \nu_{\text{ref}} \quad (30)$$

määritellään referenssitaajuudeksi, eli niin sanotuksi "nollataajuudeksi". Protonimagneettispektroskopiassa nollataajuus määritellään yleisesti inertin tetrametyylisilaani-yhdisteen ($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{Si}$) kautta, jossa pii-atomiin on kiinnittynyt 4 metyyliryh-

mää (-CH₃). Yhdisteessä siis protonit ovat "saman arvoisia" tuottaen yhden terävän piikin spektriin. Yhdiste on myös riittävän invariantti lämpötilan ja pH:n muutoksien suhteen [11].

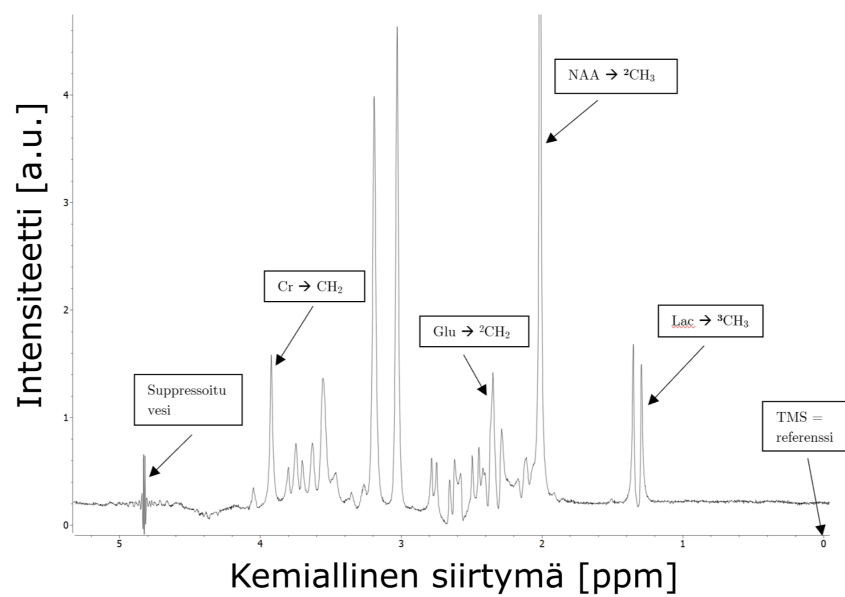
Kemiallinen siirtymä voisi intuitiivisesti olla taajuuksien $\nu_{ref} - \nu_{paikallinen}$ erotus, mutta riippuvuus kentänvoimakkuudesta tekee siitä hankalasti vertailtavan suureen. Dimensioton kentänvoimakkuudesta riippumaton suhde on käytännöllisempi, jolloin kemiallinen siirtymä ilmaistaan yhtälöllä

$$\delta = \frac{\nu_{ref} - \nu_{paikallinen}}{\nu_{ref}}, \quad (31)$$

jossa osoittajan magnitudi on kuusi kertaluokkaa pienempi kuin nimittäjän. Kemiallisen siirtymän yksikkönä käytetäänkin yleisesti $1/10^6 = \text{ppm} = \text{parts per million}$.

Kemiallinen siirtymä määrittelee siten protonispektrin rungon, (Kuva 5), jossa huippujen lukumäärä viittaa molekyyliyhymien lukumäärään ja niiden protonien keskinäisiin kytkentöihin, pinta-ala ryhmien protonien suhteellisen määrän ja siirtymä itsessään kertoo ryhmien tyypistä joissa protonit ovat sidoksissa. Spektrin tulkinta ei ole tosin edellämainitun yksiselitteistä protonien sidoksista riippuvien skalaarikytkentöjen (J -kytkentöjen) vuoksi. Esimerkin vuoksi etyynimolekyylin $\text{H}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$ päätyprotonit vaikuttavat spiniensä kautta toisiinsa, vaikka näiden välillä on peräti kolmen sidoksen matka. Tästä johtuen molekyyleillä voi olla useampi (lähekkäinen) energiatila, joka näkyy spektrissä piikkien kahdentumisena, jakautumisena tai sekoittumisena.

Siirryttäessä taajuusspektrissä vasemmalle varjostus σ vähenee, paikallinen magneettikenttä \mathbf{B}_{eff} kasvaa, jolloin kemiallisen ryhmän protonien larmor-taajuus kasvaa ja siten kemiallinen siirtymä kasvaa. Kuvitteellisesti ajateltuna, jos spektristä siirryttäisiin tarpeeksi vasemmalle, jolloin $\sigma \rightarrow 0$ ja $\mathbf{B}_{\text{eff}} \rightarrow \mathbf{B}_0$ niin vastaan tulisi "vapaa" protoni larmor-taajuudella γB_0 . Tarkennettakoon, että spektristä on vaikeaa määrittää ilman ennakkotietoa juuri mitään, vaan se näyttää yksinkertaisesti



Kuva 5. Tyypillinen NMR-spektri aivojen aineenvaihduntatuotteista. Tämä spektri on Fourier-muunnos kuvan (3) signaalista, eli aika-avaruudesta taajuusavaruuteen. Spektristä on suppressoitu vesi $\sim 4,8$ ppm taajuudelta pois. Veden piikin amplitudi on noin viisi kertaluokkaa suurempi kuin minkään muun metaboliitin [12]. Jos veden signaalia ei pulssisekvenssein ja algoritmein häivytettäisi, se estäisi muiden piikkien erottumisen.

protonimolekyyliyhymien suhteellisia osuuksia. Mitattavasta kohteesta on esimerkiksi oltava "taajuussapluuna", johon FID-signaalin Fourier-muunnos sovitetaan. Pitää siis tietää, minkälaisia molekyyliä etsitään, eli kuvataanko rasvoja, metaboliitteja, proteiineja, makromolekyyliä, alkoholeja tms. Saman kaltaista referenssisovitetta käytetään esim. röntgendiffraktiospektroskopiassa [13].

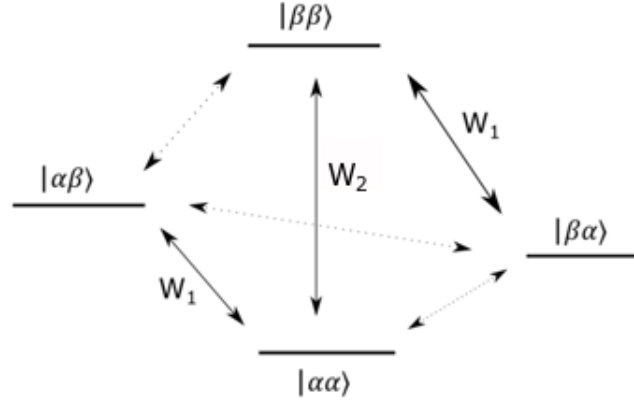
1.2.2 Relaksaatiomekanismit

Tarkasteltavan kohteen magnetisaation palautuminen alkuperäiseen, eli magnetisaatiovektorin relaksoituminen ulkoisen magneettikentän \mathbf{B}_0 suuntaiseksi aiheutuu useista erilaisista protonin ja sen lähiympäristön vuorovaikutuksista, joista tässä kappaleessa käsitellään kaksi tärkeintä. Relaksaatiota puolestaan havaitaan kahdella eri suureella: pitkittäissuuntaisella- ja poikittaisella relaksaatiolla T_1 ja T_2 .

T_1 -parametrissa puhuttaessa tarkastellaan ulkoisen magneettikentän \mathbf{B}_0 suuntaista magnetisaation palautumista 63 % alkuperäiseen voimakkuuteen [$M_z \rightarrow (1 - 1/e)M_z$], joka aiheutuu spin-populaatioiden suhteiden muutoksesta ja magneettisen energian vapautumisesta. Tästä käytetään myös nimitystä spin-hila -relaksaatio, jossa spinit vapauttavat RF-pulssista varastoitunutta energiaa ympäristönsä ytimiin ja molekyyliin. Pääasiassa relaksoituminen tapahtuu ympäristön molekyylien vaikutuksesta, koska näiden pyörimisliike lähellä protonien Larmor-taajuutta toimii energian siirättäjänä. [14]

T_2 -parametrissa puhuttaessa tarkastellaan RF-pulssin jälkeistä aikaa, joka kuluu (x, y) -tason magnetisaation vähenemiseen 37 %:iin alkuperäisestä ($M_{xy} \rightarrow \frac{1}{e}M_{xy}$). Iso osa magneettikentän \mathbf{B}_1 tahdistamia samaa vaihenopeutta kiertäviä spinejä alkaa relaksoitumaan menettäen ryhmäkoheesionsa, jolloin vastakkaiseen vaiheeseen päätyvät magneettiset momentit alkavat kumota toisiaan.

Yleistäen relaksaatiovuorovaikutukset voidaan jakaa kahteen päätapaan: Ytimien avaruudellisen ja kemiallisen kytkennän vuorovaikutuksiin [15]. Avaruudellista



Kuva 6. Kahden identtisen spin-1/2 hiukkasen muodostaman systeemin mahdolliset perustason Zeemanin energiatilat ja niiden väliset siirtymät. Kaaviossa $|\beta\beta\rangle$ esittää ytimien spinien tilaa jossa kummatkin spinit ovat ulkoista magneettikenttää vastaan. W_1 tai W_2 osoittaa magneettisen kvanttiluvun määrän muutoksen. Transitio $|\beta\beta\rangle \rightarrow |\alpha\alpha\rangle$ vastaa suoraa T_1 relaksoitumista.

vuorovaikutusta kutsutaan dipolaariseksi relaksaatioksi, joka johtuu magneettisesta dipoli-dipoli vuorovaikutuksesta. Tässä saman molekyylin *intramolekulaarisen*, tai viereisen molekyylin *intermolekulaarisen* protonin pyörimisliikkeen ($\tau_C = 1$ rad/s) ja spinin synnyttämä magneettinen momentti vaikuttaa toisen protonin synnyttämään paikalliseen magneettikenttään muuttaen tämän orientaatiota ja vaimentaen voimakkuutta [16].

Avaruudellisessa kytkennässä T_1 -parametrin voi esittää myös spin-populaatioiden ja näiden välillä tapahtuvien siirtymisten todennäköisyyksien kautta (Kuva 6), jolloin T_1 määritellään yhtälöllä

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{1}{T_1} = 2W_1 + 2W_2. \quad (32)$$

Huomataan, että mitä nopeammin populaatio muuttuu, siten vaikuttaen pitkittäis-suuntaiseen magneetisaatioon, sitä lyhyempi T_1 -relaksaatioaikaparametri. Dipolaarinen relaksaatio on erittäin etäisyysriippuvainen, vaikuttaen tehokkaimmillaan vie-

reisiin sidosprotoneihin [15] yhtälöllä

$$\frac{1}{T_1} \propto \frac{1}{r^6} [B(\omega_L) + 4B(2\omega_L)], \quad (33)$$

josta huomataan, että pitkittäinen relaksaatiovaikutus pienenee etäisyyden kuudenteen potenssiin ja siihen vaikuttaa myös paikalliset magneettikentät sekä yksinkertaisella että kaksinkertaisella Larmor-taajuudella. Dipolaarinen relaksaatio vaikuttaa samoin argumentein myös T_2 -parametriin, mutta niiden lisäksi hyvin alhaisilla $\tau_c \ll 2\pi/\omega_L$ lähiympäristön molekyylien pyörimisnopeuksilla on relaksoitumista nopeuttava vaikutus.

Toinen vuorovaikutustekijä on skalaarikytkentäinen (J -kytkentäinen) relaksaatio. Skalaarivuorovaikutuksesta atomit muodostavat energieettisesti eriarvoisia sidoksia, joiden spinien orientaatiota ohjaavat Fermin kontaktisäännöt ja Paulin kieltoisäännöt. Skalaarikytkentä ja -kytkentävakiot ovat muutenkin suuressa roolissa spektroskopiassa spektriipiikkien multiplisiteettien aikaansaajina, jossa spektriin piiryy yhdisteen lähiprotonien aikaansaamat ei-degeneroituneet energiatilat.

Skalaarikytkentäisessä relaksaatiossa ytimet vaikuttavat siis keskenään epäsuorasti elektronisidostensa kautta, jossa ytimen A nopea T_1 -relaksaatio saa aikaan spiniensä orientaatioiden muutoksen vuoksi vaihtelevan lähimagneettikentän, joka vaikuttaa ytimeen B relaksoivasti.

1.3 Aiempi aiheeseen liittyvä tutkimus

Laitteiden suorituskykyä ja keskinäistä vertailua on tutkittu useissa artikkeleissa niin valmistajien välillä kuin eri kenttävoimakkuuksien kesken [17] [18] [19]. Kuvauskohteet ovat vaihdelleet fantomien ja ihmisten välillä. Erityisesti tämän opinnäytetyön kannalta kiinnostava tutkimus löytyy Povazan et. al. [2], jotka ovat tutkineet kolmen valmistajan välisiä mittauksia (Philips, GE, Siemens) *in vivo* potilailla useilta eri alueilta aivoista. Tulokset oli ilmoitettu aineenvaihduntatuotteiden suhteina

(metaboliitti / tCr), eikä metaboliittien absoluuttisina arvoina. Myöskään erillisiä relaksaatioaikakorjauksia ei oltu tehty.

Tutkimus osoitti, että tulokset *ovat sinällään* vertailukelpoisia keskenään, joskin valmistajakohtainen kontribuutio ja yksilötason biologinen eroavaisuus kudoksissa lisäsin keskinäistä vaihtelua ja myöhempi protokollien tarkastelu lienee tarpeellista.

K. Koskensalo tutki myös gradussaan tutkimuksien siirrettävyyttä [1] käyttäen tämän opinnäytetyön Philipsin Ingenuity MRI-kameraa verratessaan sitä kenttävoimakkuudeltaan 1.5T vastaavaan. Tutkimuksessaan Koskensalo käytti sekä edellisen tutkimuksen tapaan *in vivo* tutkittavia, että myös samaa GE:n valmistamaa fantomia, jota tässä Pro gradu tutkielmassa käytetään. Datan analysoinnissa jätettiin Povazanin tapaan myös tarkemmat² relaksaatioaikakorjaukset tekemättä. Vastoin Povazanin tuloksia, Koskensalo ei katsonut laitteiden välisiä tuloksia yhteneväisiksi.

1.4 Tutkimuksen tavoitteet

Opinnäytetyössä tavoitellaan vastausta tutkimuskysymykseen, millä ehdoin tarkasteltavien laitteivalmistajien laitteiden välillä voitaisiin siirtää tutkimuksia, perustuen vakioituun kuvauskohteeseen.

Tässä opinnäytetyössä kuvauskohteena on fantomi, jonka pitoisuudet ja ympäristö ovat tunnettuja. Tämän avulla yritetään selvittää kuinka absoluuttiset pitoisuustulokset vertautuvat kahden eri valmistajan laitteilla, simuloiden oikeaa tutkimustilannetta ihanneolosuhteissa. Myös kreatiiniin suhteutetut arvot julkaistaan vertailukelpoisuuden vuoksi.

Relaksaatioaikakorjaus vaikuttaa metaboliittien pitoisuusarvoon ja sen tarpeellisuutta tarkastellaan myös käytännön tasolla kreatiiniin suhteutettujen pitoisuuksien avulla. Toisin sanoen, onko relaksaatioaikakorjaus tarpeellista tehdä ylipäättänsä

²Mittausdatan analysointiohjelmat, kuten TARQUIN ja LCModel arvoivat signaalien vaimenemisen yleisellä tasolla omilla algoritmeillaan, joten molekyyliyhymien relaksoituminen on otettu arvouden huomioon.

diagnostisessa tutkimuksessa, jossa indikaatioina ovat metaboliittien suhteet.

1.5 Tutkimuskohteet

Kuten aikaisemmin on mainittu, ydinmagneettinen resonanssispektroskopia sopii lukuisiin kvantitatiivisiin tutkimuksiin [12]. Opinnäytetyössäni tutkimuskohteina ovat aivo- ja rasvatestitutkimuskohde, eli aivo- ja rasvafantomi. Tutkimuksen kuvauksissa ja datankeruussa olisi voinut käyttää ihmisiä tai muita eläimiä *in vivo*, mutta fantomeilla tuloksista saa tilastollisesti vertailtavia eri laitteiden kesken tunnettujen tasaisten ainemääriensä vuoksi [20]. Fantomin kemiallinen ympäristö on myös homogeenisempi, vähentäen elävän kudoksen aiheuttamia häiriöitä.

Määrittämällä aineenvaihduntatuotteiden eli metaboliittien pitoisuuksia ja osuuksia, voidaan aivoista tutkia noninvasiivisesti esimerkiksi *in vivo* energia-, sokeri- ja proteiiniaineenvaihduntaa [21]. Aivofantomissa on mallinnettu tärkeimmät aivojen patofysiologiaan liittyvät metaboliitit, näiden tyypillinen konsentraatio ja suhde toisiinsa.

NMR:llä voidaan määrittää rasvojen määriä ja tyyppejä elintarvikkeista, mitä voidaan sitten vertailla tuoteselosteissa ilmoitettuihin lukemiin. Ihmisvartalosta voidaan myös non-invasiivisesti ja ilman ionisoivaa säteilyä määrittää rasvoja kudoksissa, kuten maksan rasvan määrää ja laatua [22].

Seuraavassa kahdessa kappaleessa käydään läpi opinnäytetutkimuksessa esiintyvän neljän metaboliitin merkitystä ja koostumusta *in vivo* tutkimuksissa, sekä kuuden eri rasvan NMR-määrittämissä tekniikkaa ja merkitys ihmisen fysiologiassa.

1.5.1 Metaboliitit

NAA:n, eli ***N*-asetyyliaspartaatti** $C_6H_9NO_5$, on keskus- ja ääreishermostosta paikallistettava välittäjäaineaineenvaihduntaan liittyvä metaboliitti, jonka spesifiä tehtävää ei ole lukuisista tutkimuksista huolimatta pystytty selvittämään [23]. Pitoi-

suuksien vaihtelulla on kuitenkin havaittu olevan yhteyksiä keskushermostoston aktiivisuuteen ja siihen liittyviin tauteihin. Esimerkiksi alentuneet pitoisuudet voivat indikoida MS-tautia [5] ja kohonneilla NAA-pitoisuuksilla otsalohkon alueella on havaittu yhteys Aspergerin syndroomaan. [24]. NAA:n on uskottu osallistuvan veden poistamiseen hermosoluista, aksonien myeliinituppien synteisiin ja mitokondrioiden energiantuottoon [23].

Resonanssispektrissä asetyylin metyyliiryhmän ($-\text{CH}_3$) kolme protonia ja niiden viereiset sidokset saavat aikaan spektrin huipun noin 2 ppm taajuudelle. Koska aspartaatti on keskushermoston toiseksi yleisin aminohappo heti glutamaatin jälkeen, singlettipiikin pinta-ala on suurin ja hallitsevin aivojen metaboliittispektristä.

Glutamaatti (Glu), $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_4\text{N}$ on keskushermostossa esiintyvä yleisin aminohappo ja hermosolua eksitoiva (edistävä) synapsien välittäjäaine. Glutamaatin resonanssispektri on hieman ongelmallinen tulkita kahden metyleeniryhmän ($=\text{CH}_2$) ja metiiniiryhmän ($\equiv\text{CH}$) voimakkaan skalaarikytken vuoksi. Tämä tarkoittaa Zeemanin energiatilojen [Kuva 6] jakautumista useiksi energiatasoiksi ja siten useiksi lähekkäisiksi spektrihuipuiksi. Glutamaatin huiput sekoittuvat noin 2.35 ppm taajuudella myös NAA:n, glutamiinin ja glutamaatin vastavaikuttajan GABAn (gamma-aminovoihappo) kanssa, joka on hermosolujen synapsiliikennettä inhihoiva (jarruttava) proteiini [25].

Huippujen sekoittumista ja signaali-kohinasuhdetta ylipäättänsäkin voi parantaa NMR-spektrissä käyttämällä voimakkaampaa magneettikenttää $B_0 > 4 \text{ T}$, jolloin spektrin resoluutio paranee, eli spektri muuttuu "leveämmäksi" ja resonanssihuiput erkanevat toisistaan [26].

Laktaatti, eli maitohappo, lyhyemmin Lac, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ on ATP-synteesissä (energiametaboliassa) anaerobisen energiantuoton yhteydessä vapautuva aineenvaihduntatuote [27]. Luurankoliaksissa maitohappoa syntyy kovan rasituksen seurauksena, kun energiaa tarvitaan nopeammin käyttöön, kuin happea ehditään hyödyntää ATP-

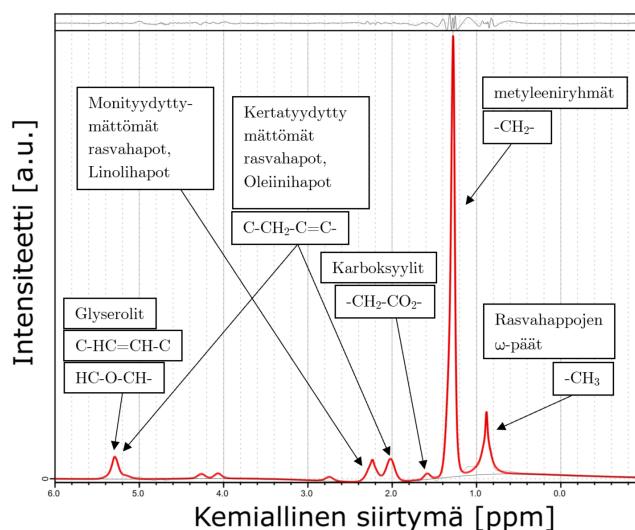
synteesiin. Tällöin glukoosista syntynyt pyruvaatti pelkistetään laktaatiksi, jotta polttoaineen hydyntäminen, eli glykolyysi voi jatkua. Aivokudoksessa laktaatin kohonnut määrä voi liittyä hapenpuutteeseen tai kohonneeseen energiantarpeeseen ja likvorissa se voi viitata bakteeri- tai virusperäisiin aivokalvontulehdukseen [28]. Hapenpuute voi viitata tuumoriin, tai iskeemiseen halvaukseen ja kohonnut energiantarve sähköisiin häiriöihin kuten epilepsiaan [29].

Laktaatin kohonnut konsentraatio aivoissa ei aina merkitse taudinkuvaa, vaan se voi kuulua myös normaaliin energiametaboliaan, kuten eri aivokeskusten aktivoitumisten yhteydessä [29]. Laktaatti on helppo havaita fantomin NMR-spektristä, koska sen metyyli-ryhmän ($-\text{CH}_3$) protonit antavat selvän duplettiresonanssin (tuplahuiput) 1.32 ppm kohdalle, jotka eivät osu yhdenkään muun huipun kanssa päällekkäin. Tosin *in vivo* mittauksissa aivojen rasvakudos aiheuttaa voimakkaan piikin laktaatin dupletin päälle, joka hankaloittaa tulkintaa [30].

Kreatiini, lyhyemmin Cr, $\text{C}_4\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$ linkittyy energia- ja fosfaattimetaboliaan, josta suoraan ATP:n kierrätykseen ja hapettomaan tuottoon [31]. Kreatiinilla viitataan usein spektrissä kokonaiskreatiiniin, eli fosfokreatiini + kreatiini. ATP luovuttaa kreatiinille fosfaattiryhmän \rightarrow fosfokreatiini, jonka se kierrättää kinaasientsyymien kautta ADP:lle, joka puolestaan muuttuu takaisin ATP:ksi.

Kreatiini energiantuottajana liittyy myös solukalvon uusiutumiseen [24] ja alentunut määrä voi viitata hermotukisolujen tuumoreihin, eli glioomaan tai aivokalvon kasvaimiin, meningeoomaan [32]. Totaalinen puutos viittaa perinnölliseen kreatiinin puutosoireyhtymään, joka aiheuttaa alentunutta älykkyyttä [33].

Kreatiinin metyyli- ($-\text{CH}_3$) ja metyleeniryhmän ($=\text{CH}_2$) protonit muodostavat huiput noin 3 ppm ja 3.9 ppm kohdalle, joista kuvassa 5 näkyy jälkimmäinen huippu.



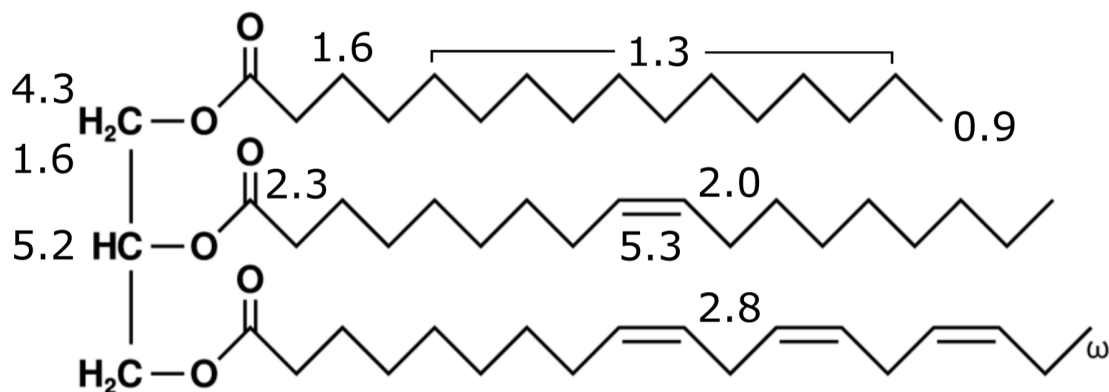
Kuva 7. Kuvan (8) tyypillisen monityydydyttymättömän triglyseridin, eli rasvamolekyylin rakennespektri 3 T magneettikentän voimakkuudella mitattuna. Spektristä on määritettävissä triglyseridin kemiallinen rakenne: glyseroli-, karboksyyli- ja hiilivetyryhmät ja siten rasvan tyyppi. Kuvaa on yksinkertaistettu protonien skalaarikytkentöjen osalta, jotta asian ydin tulisi ymmärretyksi.

1.5.2 Lipidit

Luonnolliset rasvat, eli triglyseridit ja niiden rasvahapot ovat ^1H NMR-laitteiden keskinäistä mittaustarkkuuksia vertaillessa erinomaisia kohteita. Huolimatta MRI-kameroiden matalasta kentänvoimakkuudesta $B_0 = 3\text{ T}$ tarkkuusspektroskopiakäytössä [34], on rasvaspektristä silti selkeästi havaittavissa useiden hiilivetyryhmien piikit (Kuva 7).

Triglyseridissä on ^1H NMR-spektroskopian kannalta "herkullisia" protoniryypäitä - rasvahappoja joista on helpohko määrittää erilaisia rasvatyyppejä [35]. Tutkimuksen rasvat ovat kaikki nestemäisiä, joten viitataan näihin öljyinä. Kuusi eri öljylaatua on valittu rasvahappoketjujen protonisaturaation, eli tyydyttyneisyyden perusteella täysin tyydyttyneisimmästä monityydyttymättömimpään.

Triglyseridi on eläimiltä ja kasveilta löytyvä energialähteenä ja rakennusaineina käytettävä molekyyli. Eläimillä triglyseridit kiertävät veren plasmassa lipoproteiinien kuljettamina [36] ja kasveilla ne eristetään siemenistä tai hedelmistä [37].



Kuva 8. Rasvamolekyyli, eli triglyseridi koostuu kolmesta rasvahappoketjusta ja glyserolirangasta. Kuvaan on merkitty molekyylille ominaiset protonien resonanssiipiikit [ppm], jotka ^1H NMR-spektroskopia havaitsee [Kuva 7]. [35]

Rasvojen rasvahappoketjut nimetään niiden hiiliatomien määrän ja hiilisidosten perusteella. Jos rasvahappo koostuu pelkistä yksinkertaisista hiili-hiili –sidoksista -C-C- (Kuvan 8 ylin hiiliketju), rasvahappoa sanotaan tyydyttyneeksi. Jos hiiliketjussa on yksi tai useampi kaksoissidos -C=C-, sitä sanotaan kertatyydyttymättömäksi ja monityydyttymättömäksi, tässä järjestyksessä (Kuvan 8 keskimäinen ja alin hiiliketju). Triglyseridi koostuu **glyserolista**, joka toimii molekyylin selkärangana. Glyserolin HO- liittyy esteröityneenä **karboksyyli-ryhmään** -COOH, johon liittyy pariton **hiilivetyketju** [Kuva 8]. Rasvojen tutkiminen ja määrittäminen NMR-tekniikalla on mielekästä, koska tyydyttyneet rasvat ja niihin liittyvät lipoproteiinit ja kolesterolit ovat tutkimusten mukaan haitallisia eläimille aiheuttaen mm. rasvamaksaa, diabetesta, ylipainoa ja syöpää. [22] [38] [39]

Tyydyttymättömät rasvat, ja erityisesti monityydyttymättömät rasvat ovat tutkimuksien mukaan eläimille terveellisiä ja tarpellisia rasvoja, jotka auttavat alentamaan plasmasta haitallisia lipoproteiinipitoisuuksia ja siten vähentämään kolesterolia kudoksissa. [40]. Hyviä rasvoja tuottavat erityisesti kalat, merenelävät ja kasvit. Huonoja saa karjaliha- ja maitotuotteista.

Taulukko 2. Mittauksissa käytetyt aikaparametrit eri MRI-laitteilla.

	GE MRS fantomi PRESS (GE ja Philips) t [ms]	Rasvafantomi STEAM (Philips) t [ms]
Spektri		
TE	35	11
TR	3000	3000
TM		17
T₁		
TE	31	11
TR	450/600/.../1500/2000/3000/5000	2000
TM		20/80/.../260
T₂		
TE	35/40/.../70	15/30/.../75
TR	3000	2000

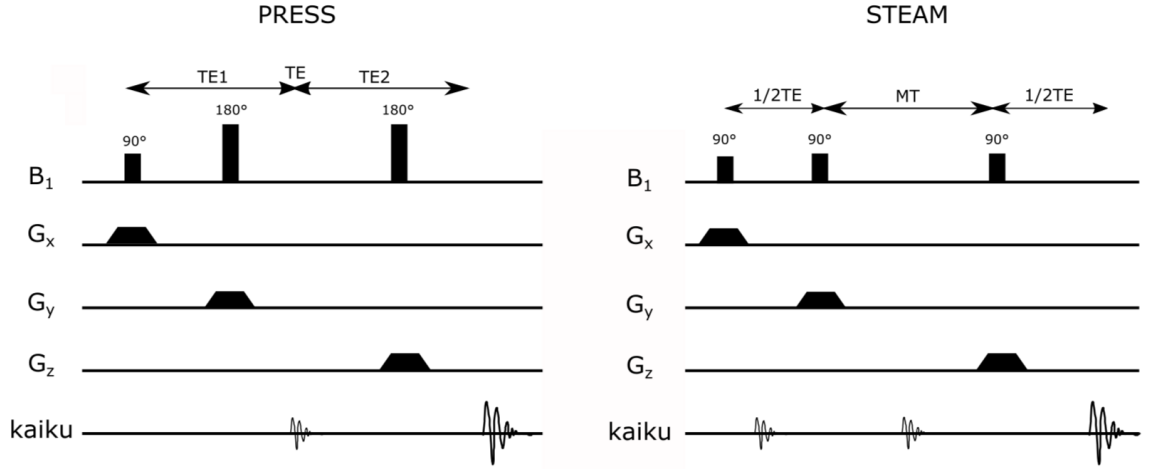
2 Materiaalit ja menetelmät

Tutkimus suoritettiin käyttämällä kahta 3 T magneettikuvauslaitetta, joista käyttöikänsä päähän tullut Philips (*3T Philips ingenuity TF PET-MR, Philips Healthcare, Amsterdam, Alankomaat*) ja sen tilalle hankittu uusi GE (*3T Signa, General Electric Company, Massachusetts, Yhdysvallat*) sijaitsivat Tyksin valtakunnallisessa PET-keskuksessa. Vaikka suurempi magneettikenttä saa aikaan spektrin tarkkuuden kasvamista ja signaali-kohinasuhteen paranemista ja siten herkkyyden kasvamista [5], riittävät nämä 3 T laitteet määrittämään tarkastelussa olevat metaboliitit ja rasvafantomien eri lipidit riittävän tarkasti kliiniselläkin tasolla [31].

NMR-spektrometreistä puhuttaessa tutkimusartikkeleissa viitataan usein protonin larmor-taajuuslukemaan kentänvoimakkuuden sijaan yhtälö (18). Tällöin 3 T MRI-laitetta kutsuttaisiin 128 MHz spektrometriksi ja erittäin tarkkaa yhdysvalloissa sijaitsevaa NHMFL³ 21 T vastaavaa 900 MHz spektrometriksi [41].

Metaboliittimittauksissa käytettiin GE:n toimittamaa aivofantomia (*MRS*

³National High Magnetic Field Laboratory



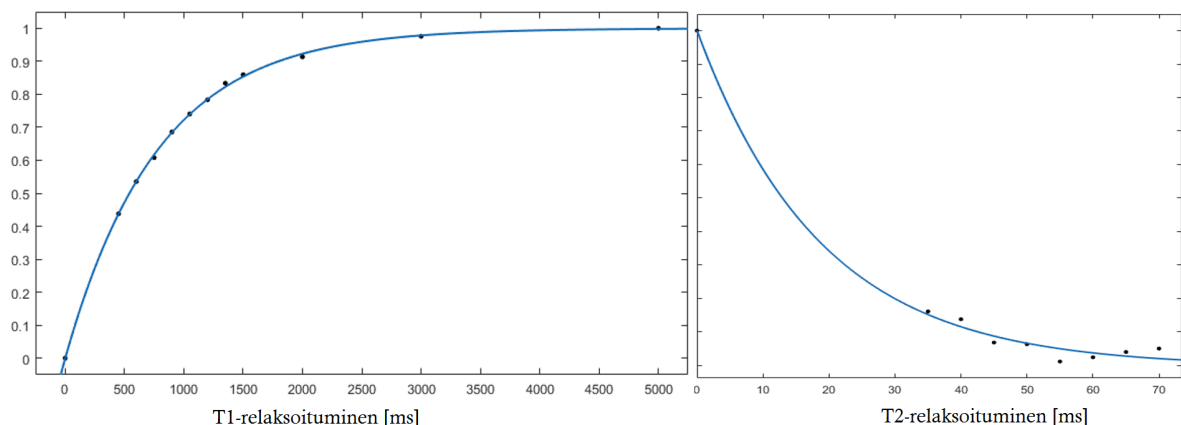
Kuva 9. Mittauksissa käytetyt pulssisekvenssit, joissa TE on kaiunaika, $TE = TE_1 + TE_2$, $G_{x,y,z}$ on viipalevalintagradientit ja MT on sekoitusaika.

Taulukko 3. Datan jälkianalysoinnissa LCModelilla käytetyt parametrit. Ppmst ja ppmend määrittävät spektrin taajuusalueen, w_conc veden molaarisuuden fantomin nesteessä, atth2o vaimennuskertoimen, unsupr määrittelee onko mukana vaimentamaton vesispektri, roomt ilmaisee huoneenlämpöä ja vitro kuvauskohteen olevan fantomi.

	ppmst	ppmend	w_conc	atth2o	unsupr	roomt	vitro
Parametri	0,2	4,0	55550	1	T	T	T
Yksikkö	ppm	ppm	mM	[-]	[-]	[-]	[-]

HD sphere, General Electric Company, Massachusetts, Yhdysvallat), jonka sisältämät aineenvaihduntatuotteet ja konsentraatiot ovat tunnettuja [20]. Mittaukset olivat kolmivaiheisia, joissa määritettiin tarkka MR-spektri, sekä T_1 - ja T_2 -relaksaatioajat. Määrittelyksissä käytettiin PRESS-mittaussekvenssiä (Kuva 9). Käytetyt TE - ja TR -ajat ovat Taulukossa (2).

Relaksaatioaikoja ja pitoisuuksia analysoitaessa mittauksen tulkintaan käytettiin kummankin valmistajan osalta maksullista LCModel-ohjelmaa [42]. Ohjelma on nopea käyttää ja kokolailla automatisoitu. Oletusasteusten lisäksi Taulukon (3) parametrejä käytettiin myös kummankin valmistajan tapauksessa.



Kuva 10. Metaboliittien T_1 - ja T_2 -relaksaatioaikojen määrittämiset. Jokainen mittapiste edustaa MR-spektrin [kuva 5] metaboliitin amplitudia. Mittapisteisiin on sovitettu eksponentiaaliset käyrät ja yhtälöstä on ratkaistu b -parametri. Relaksaatioajat saadaan parametrin käänteisluvusta, eli $T_{1,2} = 1/b$. Kuvaajat kuuluisivat olla päällekkäin, koska relaksoituminen tapahtuu samanaikaisesti. Vierekkäiset kuvat tosin havainnollistavat sarjan toiston, jolloin seuraavan T_2 -relaksoitumisen magnitudi riippuu T_1 -relaksoitumisen tilasta.

Relaksaatioaikamäärittäminen oli tässä tutkimuksessa harjoituksena ja tukena spesifien metaboliittien tunnistuksessa [43], mutta kliinisessä käytössä aivokudoksen relaksaatioaikamäärittämisellä on oma roolinsa tunnistettaessa sairauksia, kuten Alzheimerin tautia, Parkinsonin tautia tai syöpäkudoksia [44]. Metaboliittien T_1 -relaksaatioajat määritettiin yhtälön (26) mukaisesti mittaamalla signaalin intensiteettiä [Taulukko 2] TR -aikojen funktiona ja ratkaisemalla siitä T_1 -parametri (Kuva 10). T_2 -mittaukset suoritettiin muuttamalla TE -aikoja. Kaikki metaboliittimäärittämiset mitattiin PRESS-protokollalla (Kuva 9).

Kun relaksaatioajat oli määritetty spektreistä, metaboliittien **pitoisuudet** voitiin määrittää. Pitoisuudet ovat suoraan verrannollisia spektrin signaalin piikkien amplitudeihin, jotka suhteutetaan vesimolekyylien tunnettuun konsentraatioon puhtaassa nesteessä $c_{H_2O} = 55,5$ mol/l ja kemialliseen siirtymään $\delta_{H_2O} = 4,8$ ppm [45].

Piikkien amplitudit pitää vielä korjata molekyylien erilaisten relaksaationopeuk-

sien vuoksi yhtälöllä

$$A_{korjattu} = \frac{A_{mitattu}}{e^{-TE/T_2} \cdot [1 - e^{-TR/T_1}]}, \quad (34)$$

jossa TR on aika, jonka jälkeen pulssisarja toistetaan, TE kaiun aika ja T_1 ja T_2 ovat määritettyjä metaboliiteille ominaisia relaksaatioaikoja [46]. Tämän jälkeen pitoisuus lasketaan yhtälöllä

$$c = \frac{A_{met}}{A_{H_2O}} \cdot \frac{H_{H_2O}}{H_{met}} \cdot c_{vesi}, \quad (35)$$

jossa A on mitattu amplitudi, H on spektrin piikkien muodostavien protonien lkm. ja c on konsentraatio [45].

Rasvamittauksia varten rakennettiin fantomi (Kuva 12), jossa oli kuutta eri tunnettua öljyä [Taulukko 4]. Rasvan suuret triglyseridi-molekyylit pyörivät hitaammin kuin veden molekyylit, jolloin myös niiden magnetisaatio on herkempi ja nopeampi relaksoitumaan [47]. Mahdollisimman suuren rasvasignaalin ja rasvan ja veden kontrastin saavuttamiseksi TE -aika asetettiin niin pieneksi kuin mahdollista, jolloin kuvaukset suoritettiin STEAM kuvaussekvenssillä (Kuva 9).

2.1 MRI-kamerat ja kuvauskohteet

Kaikki mittaukset suoritettiin käyttämällä analogista 32-kanavaista pääkelaa, jonne fantomit aseteltiin sisään. Rasvafantomi kuvattiin Philipsillä aluksi Dixon-protokollalla [48], jonka avulla VOI (volume of interest) aseteltiin spektrin määrittystä varten. Aivofantomi kuvattiin T_1 -painotteisella protokollalla, johon spektrin VOI aseteltiin. Koejärjestely, mittaukset ja protokollat olivat kliinisten aivokuvantamisen mukaisia.



Kuva 11. Vasemmalla Philips Ingenuity 3T PET-MRI [49], jossa erilliset magneetti- ja PET yksiköt, joiden välillä potilaspöytä liikkuu. Oikealla GE Signa 3T PET-MRI [50], jossa integroituna kummatkin yksiköt. Jälkimmäinen ratkaisu nopeuttaa potilaan kuvaamista, koska kumpaakin modaliteettia voidaan kuvata samaan aikaan.

2.1.1 Philips Ingenuity TF PET/MR

Philipsin järjestelmä koostuu *Achieva* 3 T MR-kamerasta ja *time-of-flight* -laskentaan kykenevästä digitaalisesta PET-yksiköstä (Kuva 11). Opinnäytetyössä ei tehty PET-kuvantamista, joten se jätetään huomiotta.

PET-MR yhdistelmäkamera hankittiin PET-keskukselle vuonna 2011 ja vuodesta 2012 asti se oli päivittäisessä käytössä sekä kliinisissä että prekliinisissä tutkimuksissa aina 2019 asti, jolloin sen korvasi GE:n PET-MRI.

2.1.2 GE Signa PET/MR

GE Signa eroaa Philipsin edeltäjästään kompaktiudellaan. Siinä PET-yksikkö on integroitu samojen kuorien sisään, kun Philipsin ratkaisussa kummallekin on oma erillinen laiteyksikkönsä, joiden väliä potilaspöytä liikkuu (Kuva 11). PET-yksikköä ei käytetty opinnäytetyön tutkimuksissa. Signa otettiin kliniseen käyttöön 2020 keväällä.

Taulukko 4. Rasvafantomien sisältämät rasvatyypit ja niiden rasvapitoisuudet valmistajien ilmoittamana.

Öljyn lähde	Rasvaa [%]	Tyydyttyneet rasvahapot [%]	Kerta-tydyttymättömät [%]	Moni-tydyttymättömät [%]
Kookos	100	100	0	0
Palmu	100	41,5	45,8	12,7
Oliivi	91	13	72	6
Auringonkukka	100	12	30	58
Rapsi	100	6,7	60	29
Margariini	70	8	42	20

2.1.3 GE-Sphere MRS-aivofantomi

Aivofantomi on noin jalkapallon kokoinen vuonna 1998 valmistettu komposiittikuula. Fantomin nestetilavuus on n. 3 litraa, jossa koostumus vastaa ihmisaivojen eniten esiintyvimpien aineenvaihduntatuotteiden konsentraatiota [20]. Valmistaja on myös dokumentoinut N -asetyylisaspartaatin, kreatiinin ja koliinin T_2 -relaksaatioajat.

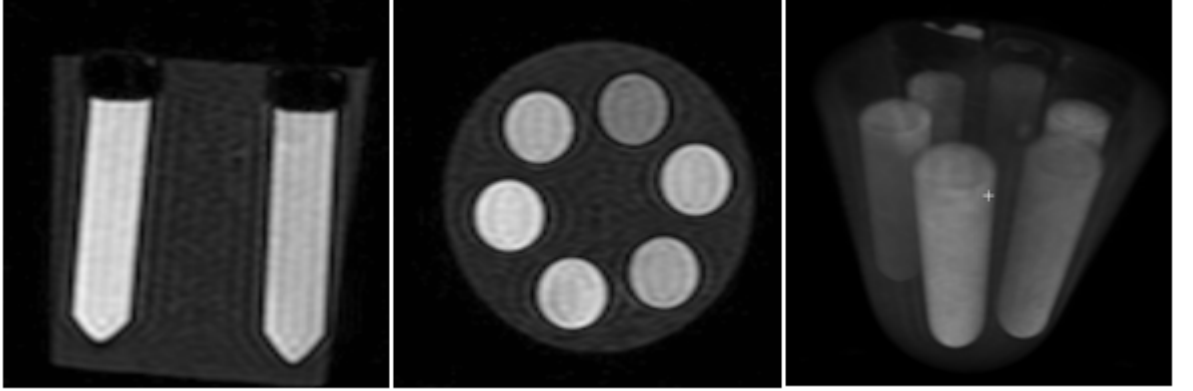
2.1.4 Rasvafantomi

Rasvaspektroskopiaa varten rakennettiin tyhjästä litran jogurttipurkista fantomi kuudelle eri rasvatyypille [Taulukko 4]. Rasvojen kokonaistilavuus kuudessa Falcon-putkessa oli $6 \times 50 \text{ ml} = 0,3 \text{ l}$. Putket liimattiin kannen sisäpuolelle korkeistaan kiinni ja fantomin ylimääräinen n. $0,7 \text{ l}$ sisätilavuus täytettiin vedellä kunnollisen vesisignaalin ja B_0 -kentän aktiivisen homogenisoinnin, eli shimmauksen aikaansaamiseksi (Kuva 12).

2.2 Tilastollinen testaus

2.2.1 Hypoteesit

Tilastollista testausta aloitettaessa määritellään aina ensin hypoteesit, eli alkuodotukset joita vastaan tuloksia peilataan. Hypoteesit ovat yksinkertaisimmillaan nol-



Kuva 12. Opinnäytetyön lieriön muotoinen rasvafantomi MR-kuvattuna Dixon-protokollalla ja out-of-phase kuvasarjalla. Kuvissa vesi näkyy tummalla ja Falcon-koeputkissa olevat rasvat vaaleammalla. Falcon-putket ovat korkeistaan liimattuna fantomin kanteen kiinni. Vasemmalla sagittaalileike, keskellä koronaalileike ja oikealla näistä muodostettu 3D-kuva.

lahypoteesi H_0 "ei ole eroa" ja tutkimushypoteesi H_1 "on eroa". Nollahypoteesia koetellaan ja siitä pidetään kiinni, elleivät mittaushavainnot ole kyllin voimakkaita hylkäämään sen. Tilastollinen testaus palauttaa jomman kumman hypoteesin todeksi.

Myös tässä tutkimuksessa tutkimushypoteesina on, että kameroiden mittaustuloksissa on tilastollisesti merkittävä ero, eli ne ovat asetettua sallittua marginaalia δ suurempia. Toisin sanoen mittauksia, kuten metaboliittien konsentraatiomäärityksiä, tai relaksaatioaikamäärityksiä toistetaan uudella kameralla N_B kertaa, kunnes kahden eri skannerin mittaukset voidaan ajatella kuuluvan samaan perusjoukkoon ja tilastollisten virheiden mahdollisuus on häviävän pieni.

Hypoteesit esitetään muodossa

$$H_0 : |\mu_A - \mu_B| < \delta \quad (36)$$

$$H_1 : |\mu_A - \mu_B| \geq \delta, \quad (37)$$

jossa μ_A ja μ_B ovat mitattujen otosten N_A ja N_B keskiarvot ja määritetty marginaali

$\delta = 5 \%$ [51].

2.2.2 Testauksen virheet ja tutkimuksen voimakkuus

Tutkimuksien suunnittelussa voima-analyysi on tulevan otoskoon arvioinnissa keskeinen työkalu. Tässä opinnäytetyössä tutkimukselle määritellään haluttu voimakkuus, joka yhdistettynä kummaltakin MRI-kameralta mitattuun dataan määrittää tarvittavan otoskoon N_B . Tämä kertoo, kuinka monella sarjalla uudella kameralla tarvitsee kuvata, jotta hyväksymisvirheen mahdollisuus olisi hyvin pieni [52].

Tilastollisessa testauksessa voi olla hyväksymisvirhe, eli "väärän positiivisen virhe", β -virhe, joka kertoo todennäköisyyden sille kun kahden joukon mittauksissa ei havaita tilastollisesti merkittävää eroavaisuutta, vaikka sellainen todellisuudessa olisikin. Toisin sanoen hyväksytään nollahypoteesi H_0 , vaikka tämä tulisi hylätä. Tätä kutsutaan myös 2. lajin virheeksi ja se esitetään ehdollisena todennäköisyytenä

$$\beta = \text{Tn}(H_0 \text{ ei hyl.} | H_0 \text{ on tosi}). \quad (38)$$

Todennäköisyyttä välttää tekemästä hyväksymisvirhettä, eli sen komplementtia merkitään

$$(1 - \beta) = \text{Tn}(H_0 \text{ hyl.} | H_0 \text{ ei tosi}), \quad (39)$$

joka kertoo todennäköisyyden eron **havaittavuudesta** kun **sellainen on**. Tätä kutsutaan tutkimuksen voimakkuudeksi, johon vaikuttavat otoskoot $N_{A,B}$, otoskokojen suhde κ , keskihajonnat σ , virhemarginaali δ ja p -arvo.

"Väärän negatiivisen virhe", eli hylkäämisvirhe syntyy, kun kahden otosjoukon välillä ei ole tilastollisesti merkittävää eroa, mutta sellainen kuitenkin syystä tai toisesta havaitaan. Toisin sanoen nollahypoteesi H_0 pitää paikkansa, mutta se hylätään

virheellisesti. Tätä sanotaan α -virheeksi ja sen todennäköisyyttä merkitään

$$\alpha = \text{Tn}(H_0 \text{ hyl.} | H_0 \text{ on tosi}). \quad (40)$$

Puhutaan myös tutkimuksen merkitsevyystasosta α , joka määritellään *ennen* kuin tilastolliseen testaukseen ryhdytään. Nollahypoteesin ollessa voimassa merkitsevyystaso tarkoittaa aluetta testisuureen todennäköisyysjakaumassa, jonne jouduttuaan nollahypoteesi hylätään. Kun tilastollisen testaus on valmis ja testisuureen arvo laskettu, saadaan tutkimuksen p -arvo, jota verrataan ennaltalaskettuun merkitsevyystasoon. p -arvo on toistaiseksi voimassa olevan nollahypoteesin todennäköisyys olla tosi. Yleisesti käytetyt p -arvot ovat 0,001, 0,01, 0,05 ja 0,10.

Mitä pienempi p -arvo on, sitä merkittävämpi on tutkimuksen tuoma uusi informaatio ja tutkimushypoteesin H_1 paikkansapitävyys. Pieni p -arvo tarkoittaa, että testisuure on saanut arvon, joka kuuluu todennäköisyysjakauman epätodennäköiselle alueelle (hylkäysalue).

Lääketieteellisissä tutkimuksissa voiman todennäköisyytenä käytetään yleisesti 80 % - 90 %, eli jos kahden ryhmän välillä on ero, niin vähintään 80 % todennäköisyydellä se havaitaan. Myös opinnäyttetyössä käytettiin 80 % voimakkuutta.

2.2.3 Keskiarvojen vertailu: kahden otoksen ekvivalenssitarkastelu

Opinnäyttetyön tilastollinen testaus perustuu kummankin MR-kameran mittasarjojen keskiarvojen μ_A ja μ_B ekvivalenssivertailuun [51]. Yksinkertainen keskiarvojen vertailu ryhmien välillä ei ole mielekästä eikä informatiivista, koska mittauskeskiarvojen havainnot voivat olla samanlaisia, mutta epäekvivalentteja. Yhtäläillä tulokset voivat osoittaa keskiarvojen eroavan toisistaan, mutta havainnot ovat silti ekvivalentteja [52]. Etsitään siis *tilastollisesti merkitsevää* samankaltaisuutta, eli oletetaan mittaustuloksien olevan samasta normaalisti jakautuneesta perusjoukosta peräisin.

Otoskoon suuruus tietyllä tutkimuksen voimalla voidaan kätevästi laskea netis-

tä löytyvillä laskureilla [53], taulukkolaskentaohjelmilla, tai ilmaisilla [54] ja kaupallisilla [55] tilastotiedeohjelmilla. Tilastollinen testaus suoritettiin SPSS:llä (*IBM SPSS Statistics, Versio 24.0. Armonk, NY*), jonka avulla testattiin ryhmien varianssit, keskiarvot ja korrelaatio. Otoksoon laskenta suoritettiin käyttämällä **R**-ohjelmointikielellä tehtyä skriptiä [53], jonka matemaattinen malli on seuraava.

Mitattujen otosmäärien suhde κ

$$\kappa = \frac{N_A}{N_B}, \quad (41)$$

jossa N_A on Philipislä mitattujen tulosten otosjoukko ja N_B GE:llä mitattujen vastaava. Näiden avulla GE:llä tarvittavien mittauskertojen lukumäärä N_B saadaan yhtälöllä

$$N_B = \left(1 + \frac{1}{\kappa}\right) \left(\sigma \frac{z_{1-\alpha} + z_{1-\beta/2}}{|\mu_A - \mu_B| - \delta}\right)^2, \quad (42)$$

jossa μ on keskiarvo, α tutkimuksen merkitsevyystaso (0,05) ja $1 - \beta$ on tutkimuksen voima (0,80). Yhtälöihin (42) ja (44) saadaan normeerattu testisuureen z -arvo yhtälöllä

$$z = \frac{\Delta \bar{X} - \delta}{\sqrt{\sigma_n^2/N_n}} = \frac{|\mu_A - \mu_B| - \delta}{\sigma \sqrt{\frac{1}{N_A} + \frac{1}{N_B}}}, \quad (43)$$

jossa $\Delta \bar{X}$ on tarkasteltavan satunnaismuuttujien keskiarvojen erotus, δ on testin marginaali (5 %), σ on keskiarvon keskihajonta ja σ^2 on varianssi. Tutkimuksen voima määritellään vielä yhtälöllä

$$(1 - \beta) = 2 \times [\Phi(z - z_{1-\alpha}) + \Phi(-z - z_{1-\alpha})] - 1, \quad (44)$$

jossa Φ on testisuureen normaalijakautunut TN-funktio.

3 Tulokset

Mittaukset suoritettiin kummallakin MRI-kameralla useilla toistomäärillä ($N = 5$) ja tulokset on esitetty Taulukossa (5). Metaboliittien osalta tilastollinen testaus tehtiin kummallakin kameralla mitattujen konsentraatioiden välillä, koska arvot eivät ole suoraan sidoksissa ihmisen suorittamaan määrittystapaan, vaan LCModelin algoritmi määrittelee ne omin menetelmin. Rasvojen osalta vertailumittauksia ei voitu suorittaa viime hetkellä ilmenneiden teknisten ongelmien vuoksi⁴.

Tuloksissa on esitelty fantomin nesteestä määritetyt T_1 - ja T_2 -ajat, joiden avulla relaksaatiokorjaukset tehtiin määritettyihin konsentraatioihin. Konsentraatiomittausten välillä fantomia käytiin kääntelemässä, jotta saataisiin mahdollisimman hyvä kokonaiskuva nesteen koostumuksesta. Fantomia käännettiin myös kokonaisten aikasarjamittausten välillä. Mittauksia oli valvomassa kokenut sairaalafyysikko ja erikoistuva fyysikko.

Mittaustulokset ovat taulukossa (5), josta löytyy T_1 - ja T_2 -ajat, sekä konsentraatiot fantomin metaboliiteille. Kuvat (15, 16 ja 17) esittävät nämä suureet vertailevina viiksi- ja pylväsesityksinä. Kummankin valmistajan systeemillä signaalien puoliarvoveveys pysytteli $< 2\text{Hz}$ ja S/N-suhde > 50 . Taulukossa (6) on tulokset SPSS tilasto-ohjelmalla tehdystä kahden riippumattoman otoksen t -testistä. Jokainen metaboliitti testattiin erikseen Levenen ja t -testimuuttujan avulla kummankin laitevalmistajan kesken. Levenen testi otti kantaa laitevalmistajien varianssin samankaltaisuuteen, joka puolestaan vaikutti t -testin suoritustapaan. Jälkimmäinen testi otti kantaa oliko laitevalmistajien välillä mitatuissa pitoisuuksien keskiarvoissa tilastollisesti merkittävää eroavaisuutta.

⁴GE:n uudella skannerilla ei ollut vielä opinnäytetyön kirjoituksen aikana pääsyä tutkijatyökaluihin, jotta STEAM-protokollan TM-aikaa olisi voitu säätää relaksoitumisen määrittämiseksi. Rasvatutkimukset jatkuvat väitöstutkimuksen yhteydessä.

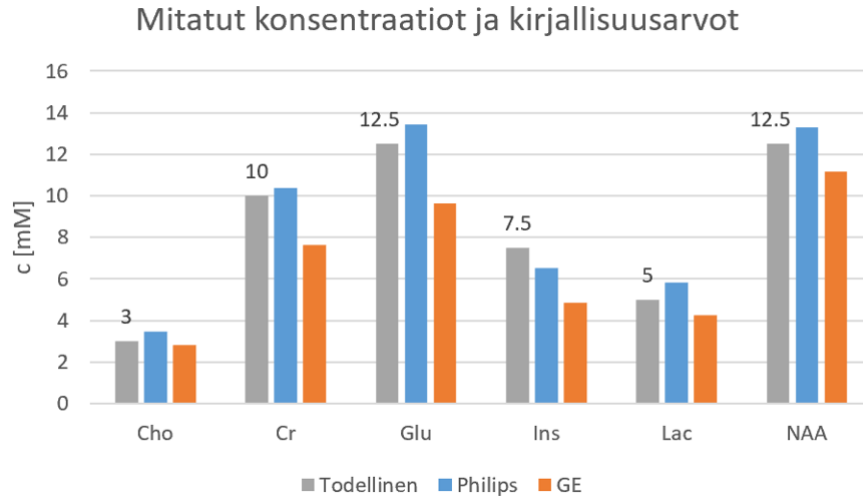
Taulukko 5. Lopputuloksina ilmoitettavat kummallakin MRI-skannerilla suoritetuissa mittauksissa käytetyt metaboliitit ja niiden relaksaatioaikojen mitattu keskiarvo ja keskihajonta (SD). Viimeisessä sarakkeessa ovat fantomin valmistajan ilmoittamat todelliset pitoisuudet.

	T1 [ms]		T2 [ms]		c [mM]		Kirj.[20]
	Philips	GE	Philips	GE	Philips	GE	
CrCH ₂	500(200)	-	150(10)	-	5,4(0,2)	3,8(0,6)	-
Cho	290(30)	-	150(20)	6000(6000)	3,5(0,2)	2,8(0,1)	3
Cre	460(30)	2600(500)	280(50)	200(200)	10,4(0,2)	8(2)	10
Glu	460(60)	800(800)	35,3(0,6)	36,5(0,4)	13(1)	10(3)	12,5
Ins	270(40)	-	10,1(0,7)	25(2)	6,5(0,9)	5(2)	7,5
Lac	800(200)	820(70)	160(30)	80(20)	5,8(0,2)	4,2(0,7)	5
NAA	800(60)	890(50)	260(30)	680(40)	13,3(0,2)	11,1(0,2)	12,5

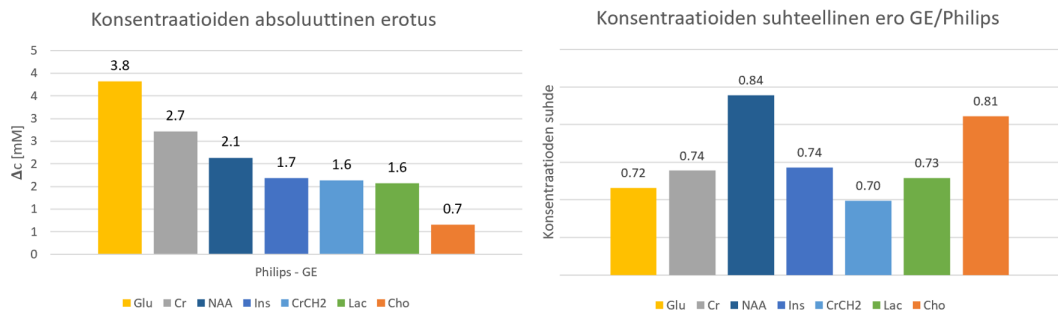
Kuvassa (14) esitetään konsentraatioiden erotus ja suhteellinen eroavaisuus laitteiden kesken. Kuvasta voi huomata saman, kuin Taulukosta (8), että absoluuttiset arvot ovat selkeästi eriävät ja kertovat vain puoli totuutta kokonaiskuvasta, verrattuna suhteellisiin arvoihin, joissa kaikissa on maksimissaan 14 % ero laitteiden välillä. Kuva (13) esittää valmistajan ilmoittaman todellisen konsentraation ja kummallakin laitteilla mitatut arvot rinnakkain. Tästä huomataan myös GE:n arvojen olevan järjestäen matalimmat Philipsiin verrattuina.

Metaboliitteja kokonaisuutena tarkastellen taulukosta (6), t -testin p -arvo oli kaikilla muilla metaboliiteilla $< 0,05$, paitsi glutamaatilla, jolloin nollahypoteesi H_0 voidaan suurella varmuudella hylätä ja todeta keskiarvojen olevan merkittävästi eroavat. Tämä kertoo keskiarvojen olevan epäekvivalentteja keskenään, eikä tutkimuksia voi ilman analysointiohjelmien parametrien keskinäistä kalibrointia siirtää näiden kahden laitteen välillä.

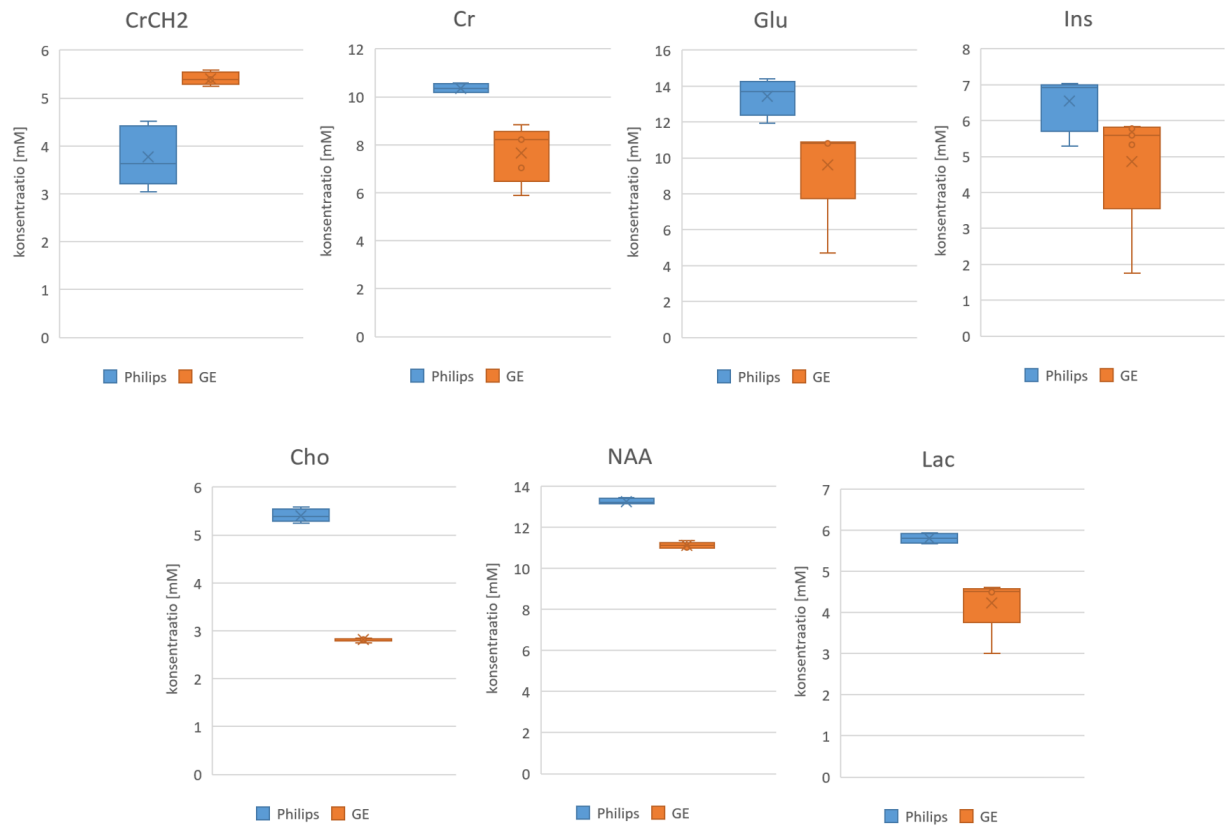
Mittausdatat korreloivat positiivisesti toistensa kanssa (Kuva 18). Vaikka arvojen välillä olikin vaihtelua, korrelaatio oli vahvaa ($r = 0,932$). Tutkimuksen voimakkuutta tarkastellessa otoskoon arvioinnissa marginaaliksi δ asetettiin yhtälöön (37) maksimiarvoksi 5 %. Tarvittavat mittauksien toistot luotettavaa laitteiden vä-



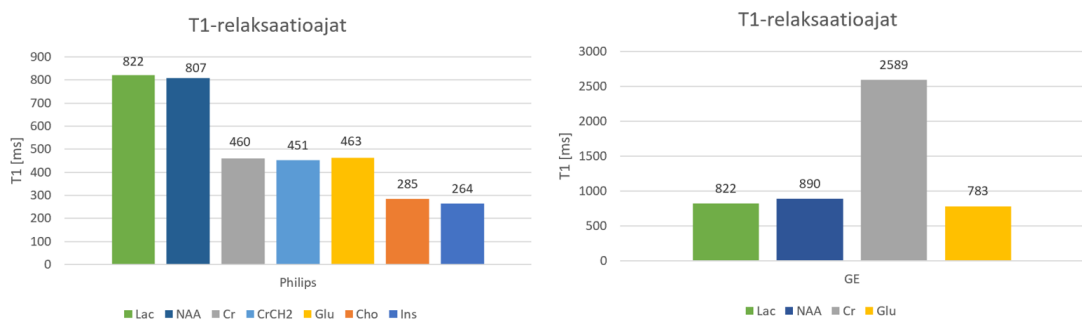
Kuva 13. Kummankin laitteen tulokset vertailussa fantomin valmistajan ilmoittamiin pitoisuuksiin [20]. Tarkat arvot ovat ilmoitettu taulukossa (5).



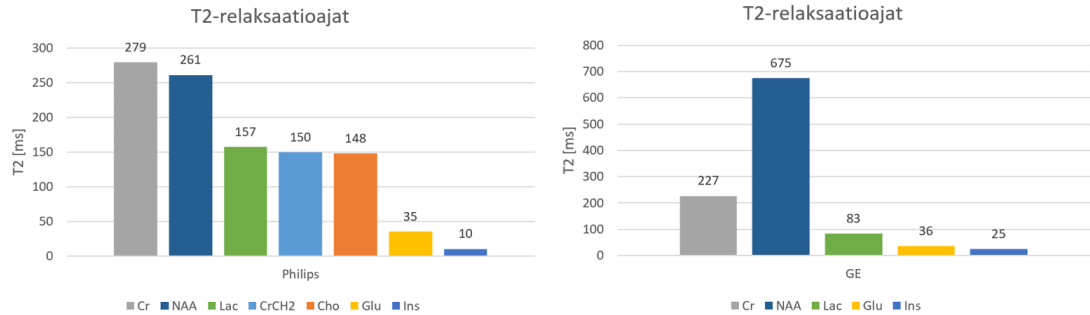
Kuva 14. Kuvassa vasemmalla konsentraatioiden erotus Δc kahden skannerin välillä, joka on saatu vähentämällä Philipsillä mitattu arvo GE:llä mitatulla arvolla. Glutamaatilla oli suurin eroavaisuus skannerien kesken arvolla 6,1, mM, kun kokonaiskonsentraatio fantomissa oli vain 12,5 mM. Kuvassa oikealla konsentraatiotarvot skaalattuina Philipsin arvoihin. Suhdeluku vaihtelee 0,70 ja 0,84:n välillä.



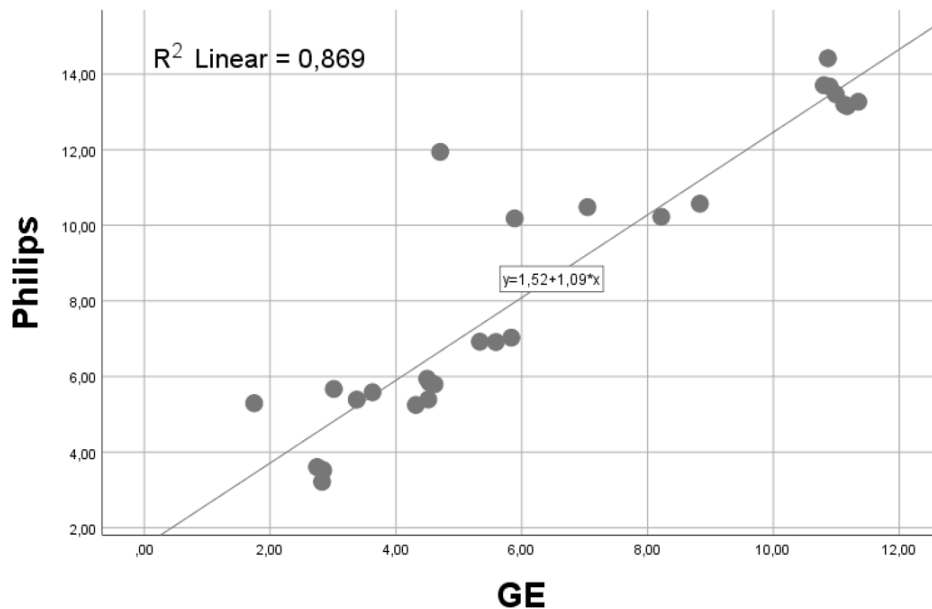
Kuva 15. Kummallakin MRI-skannerilla mitatut testikuvauskohteen aineenvaihduntatuotteiden konsentraatiot viiksilaatikkoesityksinä. Kuvasta voidaan havainnoida Philipsin skannerin saavan jokaisen metaboliitin arvolle hieman korkeamman tuloksen.



Kuva 16. T_1 -relaksaatioajat mitattuina kummallakin MRI-skannerilla. GE:llä mitatuista metaboliiteista inosytoli (ins), kreatiinimetyyleeni (CrCH2) ja koliini (Cho) puuttuvat, koska näiden relaksoituminen TR-parametrin funktiona ei ollut kyllin selkeää ajan laskemiseksi.



Kuva 17. T_2 -relaksaatioajat laskettiin muuttamalla kaiun aikaa (TE) pidemmäksi, jolloin metaboliitin signaalin amplitudin eksponentiaalisesta vähenemisestä laskettiin T_2 -aikaparametri. GE:n mittauksista puuttuvat koliini ja kreatiinimetyyleeni, koska signaalien relaksoituminen ei ollut havaittavissa kyllin varmasti.



Kuva 18. Pearsonin korrelaatio kummankin skannerin konsentraatiomäärityksissä on tilastollisesti merkittävästi lineaarinen $p < 0,001$ ja korreloi erittäin voimakkaasti $r = 0,932$ (SPSS).

Taulukko 6. Kummankin skannerin konsentraatioarvoja testattiin toisiaan vastaan. Ryhmille tehtiin ensin Levene-testi, jolla selvitettiin ovatko varianssit ryhmien kesken yhteneväiset. Tämän jälkeen voitiin tehdä varsinainen kahden riippumattoman otoksen vertailu, joista osoittautuukin laitteiden välisten varianssien olevan yhtäläiset, mutta mittauksien keskiarvot eroavat merkittävästi ($p < 0,05$) kaikkien paitsi Inositolin (Ins) ($p < 0,05$) osalta.

	Levene		t-testi keskiarvoille				
	F	p	t	df	p	$\Delta\bar{x}$	ΔSD
CrCH ₂	21,314	0,004	5,151	6	0,002	1,5	0,3
Cho	3,810	0,099	7,391	6	0,000	0,66	0,09
Cr	10,471	0,018	4,356	6	0,005	2,9	0,7
Glu	3,565	0,108	2,534	6	0,044	4	2
Ins	2,344	0,177	1,820	6	0,119	2	1
Lac	6,397	0,045	4,237	6	0,005	1,6	0,4
NAA	0,001	0,983	20,700	6	0,000	2,1	0,1

Taulukko 7. Tarvittavien mittauskertojen lukumäärä GE:n skannerilla N_B , jotta tutkimuksella olisi 80 % voimakkuus verrattaessa ryhmiä. Keskiarvojen samankaltaisuuksien marginaaliksi asetettiin $\delta = 5$ %.

	CrCH ₂	Cho	Cr	Glu	Ins	Lac	NAA
N_B	1	1	5	93	5	1	1

listä tilastollista testausta varten on ilmoitettu taulukossa (7). Konsentraatioiden suhde kreatiiniin on esitetty taulukossa (8). Taulukossa tulokset on ilmoitettu sekä relaksaatiokorjattuna, että ilman. Kirjallisuusarvot ovat valmistajan ilmoittamat. Tilastollinen testaus osoittaa että nollahypoteesi H_0 pitää, koska $p > 0,05$ jokaisella metaboliitilla. Tämä tarkoittaa valmistajien välisten ryhmien olevan niin varianssiltaan, kuin keskiarvoltaan ekvivalentit.

4 Keskustelu

Konsentraatiomäärittelyksissä kaksi suurinta muuttujaa, jotka myötävaikuttavat lopulliseen pitoisuustulokseen ovat mittausparametrit ja analysointiparametrit. Tässä tutkimuksessa kummatkin muuttujat pyrittiin vakioimaan. Mittausparametrit ase-

Taulukko 8. Metaboliittimittausten tulokset ilmoitettuna suhteessa kreatiinin ja fosfokreatinin summaan (tCr). Taulukossa on ilmoitettu suhdeluku sekä relaksaatiokorjauksella, että ilman. Laitteiden väliset tulokset ovat huomattavan samankaltaiset ja keskenään tilastollisesti ekvivalentit kummassakin ryhmässä (*kahden riippumattoman otoksen t-testi, SPSS*).

	NAA/tCr	Lac/tCr	Ins/tCr	Glu/tCr	Cho/tCr
RELAKSAATIOKORJATTUNA					
Philips	1,28	0,56	0,63	1,25	0,34
GE	1,39	0,53	0,63	1,25	0,35
<i>p</i> -arvo	0,101	0,241	0,081	0,194	0,148
ILMAN RELAKSAATIOKORJAUSTA					
Philips	1,36	0,57	0,63	1,27	0,34
GE	1,47	0,53	0,63	1,27	0,35
<i>p</i> -arvo	0,101	0,241	0,081	0,194	0,148
KIRJALLISUUSARVOT					
Fantomi [20]	1,25	0,50	0,75	1,25	0,30

tettiin samoiksi kummastakin laitteesta [Taulukko 2] ja LCModel käytti samaa algoritmia määrittäessään spektristä pitoisuudet [42].

Mitä suurempi otoskoko, sitä paremmin perusjoukon edustus näkyy. Toistomäärä $N = 5$ oli ilmeisen riittävä testaamaan kaikkien metaboliittien keskiarvoja, paitsi glutamaattia [Taulukko 7]. Karkeasti laskien tilastollisen testauksen otoskoko näillä parametreilla toivottaisiinkin olevan $N > 10$ suuruusluokkaa lääketieteellisissä tutkimuksissa [56].

Valmistajan ilmoittamiin konsentraatioihin verrattuna [20] GE:n skannerilla mitatut konsentraatiot olivat järjestäen hieman matalimmat, kun taas Philipsin skannerilla mitatut arvot olivat hiukan yli ilmoitettujen [Taulukko 5]. Philipsillä mitausarvot erosivat kirjallisuusarvoista keskimäärin $0,7 \pm 0,3$ ja GE:n $1,6 \pm 0,9$, joten Philips on lähempänä valmistajan ilmoittamia arvoja. Konsentraationmittausten varianssien ollessa kuitenkin yhdenmukaiset (levene $p > 0,05$), kummankin skannerin mittaustulokset ovat vertailukelpoisia keskenään sisäiseltä tarkkuudeltaan ja korreloivat erittäin voimakkaasti toistensa kanssa (Kuva 18).



Kuva 19. Ylärivin kuvaajat edustavat GE:n laitteella T_1 mittauksissa havaittuja signaalin voimakkuuksia ja alarivi edustaa vastaavasti T_2 mittauksia. Vasemmalla olevat kuvaajat "käyttäytyvät" odotetusti (laktaatti ja glutamaatti) ja oikealla mielivaltaisesta (fosfokoliini ja N-asetyyliaspartaatti), joista aikaparametrien määrittäminen oli mahdotonta.

Taulukossa (8) metaboliittien konsentraatiot ovat esitettynä suhteessa kreatiinin ja fosfokreatiinin summaan, kuten Povazan et. al. [2] ovat tutkimuksessaan tehneet. Tällöin laitteiden mittaustulokset korreloivat vahvasti positiivisesti ($r = 0,995$). Myös keskiarvot ja varianssit ovat keskenään ekvivalentit ($p > 0,05 \rightarrow \mathcal{H}_1$ kahden riippumattoman otoksen t -testi, SPSS) ja tulokset olivat hyvin lähellä valmistajan ilmoittamia arvoja. T_1 - ja T_2 -ajat erosivat puolestaan huomattavasti laitteiden välillä. Suurin syy tähän oli GE:n metaboliittien signaaleiden analysoinnissa, jossa voimakkuudet eivät osoittaneet eksponentiaalista trendiä aikaparametrejä vaihdettaessa (Kuva 19), vaan heittelehtivät satunnaisesti tehden sovitukselta mahdotonta. Toisin sanoen metaboliittien absoluuttiset konsentraatiot erosivat toisistaan laitevalmistajien kesken, mutta kreatiiniin suhteutetut eivät, huolimatta oliko relaxaatioaikakorjaukses tehty vai ei. Paljaiden arvojen ero johtui siitä, ettei veden ja

metaboliittien relaksoitumista otettu huomioon. Näin ollen on suositeltavaa, että käytetään metaboliittien suhdelukuja. Relaksaatioaikakorjauksella ei siis ollut merkitystä metaboliittisuhteiden yhtenevyyteen, mutta niillä oli merkitystä metaboliittien konsentraatioiden mittaustulosten oikeellisuuden kannalta. Jos vertailtavat laitteet käyttäisivät eri kenttävoimakkuutta B_0 , tilanne voisi olla eri ja siihen tämä opinnäytetyö ei ota kantaa.

GE:n järjestelmän relaksaatiomääritysten signaalin epäjohdonmukaisuutta voisi selittää piikkien huono puoliarvoveveys, mutta tässä tutkimuksessa se oli yleisesti hyväksytyn rajan < 30 Hz sisällä [57]. Virheet automaattisessa shimmauksessa ja pyörrevirtakorjaksessa saattaisi olla syypäänä tulosten epäjohdonmukaisuuksiin [57]. Toisin kuin Philipsin laitteella TE - ja TR -aikasarjat piti rakentaa omana erillisinä mittauksinaan, jolloin herää epäily, muuttuiko esimerkiksi shimmaus- tai signaalin vahvistuskertoimet jokaisen mittauksen yhteydessä.

Suurin yksittäinen vaikutus konsentraation arvoon lienee mittausdatan jälkikäsittelyssä vesi- ja metaboliittisignaalien eksponentiaalisella vaimennuskertoimella (**water attenuation**), joka oli kummankin laitteen osalta säädetty arvoon 1, joka on suositeltavaa fantomien kuvauksissa [58]. Parametri vaikuttaa veden signaalin pinta-alan suhteutettavasta metaboliitin pinta-alasta määritettävään pitoisuuden arvioon [58]. Tätä parametria säätämällä, absoluuttiset pitoisuustulokset saataisiin vastaamaan toisiaan, pitäen metaboliittien keskinäisten suhteen samana.

Yhteenvetona totean laitteiden mittauksien keskihajonnan, eli sisäisen tarkkuuden olevan ekvivalentteja, joten taulukon (7) mukaisten mittausmäärien täytyttyä mittaustulokset ovat tilastollisesti luotettavia ja korreloivat vahvasti keskenään (Kuva 18) ja tulosten eroavaisuudet kirjallisuusarvoihin ovat kummallakin lähes vakiot (Kuva 13).

Jos pyrkimyksenä on päästä samankaltaisiin absoluuttisiin pitoisuusarvoihin laitteiden mittausten kesken, analysointiohjelmat tulee kalibroida parametrien puolesta

tunnetulla kuvauskohteella. Jos tutkimuksessa tarpeellista tietoa ovat metaboliittien keskinäiset suhteet esim. kreatiiniin [Taulukko 8], tulokset ovat riittävän yhdenmukaiset, linjassa valmistajan kirjallisuusarvoihin kummallakin ryhmällä, eikä tällöin datan jälkikäsitteilyssä relaksaatioaikakorjaus olisi myöskään tarpeellista.

Viitteet

- [1] K. Koskensalo, A comparison between two mri devices with different field strengths in spectroscopic use, master's thesis, University of Turku, 2013.
- [2] M. Považan *et al.*, Radiology **295**, 171 (2020).
- [3] A. Gupta, Concepts in Magnetic Resonance, Part A **44A**, 112 (2015).
- [4] P. Zeeman, Astrophysical Journal **5**, 332 (1897).
- [5] R. de Graaf, *in vivo NMR Spectroscopy*, 2nd ed. (Jonh Wiley & Sons, LtdWest Sussex, 2007), p. 569.
- [6] R. Isidor, Phys. Review **53**, (1938).
- [7] The Nobel Prize in Physics 1944. NobelPrize.org. Nobel Media AB 2019. Wed. 10 Jul 2019.
- [8] F. Bloch, W. W. Hansen ja M. Packard, Phys. Rev. **70**, (1946).
- [9] The Nobel Prize in Physics 1952. NobelPrize.org. Nobel Media AB 2019. Wed. 10 Jul 2019.
- [10] P. Bottomley ja J. Griffiths, *Modern NMR Techniques for Synthetic Chemistry* (WileyWest Sussex, 2016), pp. 1–1099.
- [11] Q. Teng, *Structural Biology: Practical NMR Applications* (Springer US, 2013), pp. 1–431.
- [12] J. et al. Alonso, in *MR Spectroscopy of the Brain*, edited by L. Brandao (Elsevier, 2013), p. 561.
- [13] R. Sharma, D. P. Bisen, U. Shukla ja B. G. Sharma, Recent Research in Science and Technology **4**, 77 (2012).
- [14] M. L. Lipton ja M. L. Lipton, *Totally Accessible MRI* (PUBLISHER, 2008), pp. 128–138.
- [15] H. J. Reich, University of Wisconsin, Lecture Notes (2017).
- [16] I. Solomon, Phys. Rev. **99**, 559 (1955).
- [17] et. al Subechhya, Pradhan, Magn. Resonance Imaging **33**, 1013 (2015).
- [18] M. E. Ladd *et al.*, Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy **109**, 1 (2018).
- [19] et al. M. D. BOSKA, Magnetic Resonance in Medicine **238**, 228 (1990).
- [20] GE Company, MRS HD Sphere Phantom Contents, Official Product Sheet, 2004.

- [21] S. Nyman, Ph.D. thesis, University of Turku, Dep. of Chem., 1998.
- [22] P. K. Luukkonen *et al.*, Diabetes Care **41**, 1732 (2018).
- [23] D. J. Rigotti, M. Inglese ja O. Gonen, American Journal of Neuroradiology **28**, 1843 (2007).
- [24] D. G. Murphy *et al.*, Archives of General Psychiatry **59**, 885 (2002).
- [25] D. Wong, A. L. Schranz ja R. Bartha, NMR in Biomedicine **31**, (2018).
- [26] C. Gasparovic *et al.*, Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry **84**, 715 (2013).
- [27] M. Muller *et al.*, Microbiology and Molecular Biology Reviews **76**, 444 (2012).
- [28] B. A. Cunha, Journal of Clinical Microbiology **50**, 211 (2012).
- [29] J. Prichard *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences **88**, 5829 (2006).
- [30] T. Lange, U. Dydak, T. P. L. Roberts ja M. Bjeljac, Ajnr American Journal Of Neuroradiology **27**, 895 (2006).
- [31] R. Faghihi *et al.*, Journal of Medical Imaging and Radiation Sciences **48**, 233 (2017).
- [32] A. Verma *et al.*, BBA Clinical **5**, 170 (2016).
- [33] M. A. Mencarelli *et al.*, American Journal of Medical Genetics, Part A **155**, 2446 (2011).
- [34] M. Suzuki *et al.*, Molecules **17**, 6705 (2012).
- [35] J. Berglund, H. Ahlström ja J. Kullberg, Magnetic Resonance in Medicine **68**, 1815 (2012).
- [36] R. A. Cox ja M. R. García-Palmieri, *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations* (Butterworths, 1990).
- [37] J. Garavaglia, M. M. Markoski, A. Oliveira ja A. Marcadenti, Nutrition and Metabolic Insights **9**, 59 (2016).
- [38] G. A. Bray, K. K. Kim ja J. P. Wilding, Obesity Reviews **18**, 715 (2017).
- [39] V. Hanf ja U. Gonder, European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology **123**, 139 (2005).
- [40] A. G. Liu *et al.*, Nutrition Journal **16**, (2017).
- [41] R. Fu *et al.*, Journal of Magnetic Resonance **177**, 1 (2005).

- [42] S. W. Provencher, NMR in Biomedicine **14**, 260 (2001).
- [43] F. Baselice, G. Ferraioli, A. Grassia ja V. Pascazio, Sensors (Switzerland) **14**, 2182 (2014).
- [44] A. P. Haley, J. Knight-Scott, V. I. Simnad ja C. A. Manning, Magnetic Resonance in Medicine **3**, 2056 (2005).
- [45] S. Quadrelli, C. Mountford ja S. Ramadan, Magnetic Resonance Insights **9**, MRI.S32903 (2016).
- [46] C. Gasparovic *et al.*, Magnetic Resonance in Medicine **55**, 1219 (2006).
- [47] R. Salvati ja G. Gambarota, Applied Magnetic Resonance **47**, 139 (2016).
- [48] T. Dixon, Radiology **153**, 189 (1984).
- [49] H Zaidi, N Ojha, M Morich, J Griesmer, Z Hu, P Maniawski, O Ratib, D IzquierdoGarcia, Z A Fayad ja L. Shao, Phys. Med. Biol. **56**, 3091 (2011).
- [50] Medicaexpo WEB https://img.medicaexpo.com/images_me/photo-mg/70717-12423330.jpg. Noudettu 5.8.2020.
- [51] E. Walker ja A. S. Nowacki, Journal of General Internal Medicine **26**, 192 (2011).
- [52] D. Lakens, Social Psychological and Personality Science **8**, 355 (2017).
- [53] G. 2013-2019 HyLown Consulting LLC Atlanta, Calculate Sample Size Needed to Compare 2 Means: 2-Sample Equivalence, 2013.
- [54] T. Nick, Significanc Magazine 15 (2018).
- [55] C. Moeler, The Origins of MATLAB, 2014.
- [56] J. Charan ja T. Biswas, Indian Journal of Psychological Medicine **35**, 121 (2013).
- [57] Zeinali-Rafsanjani B. et al, J Biomed Phys Eng **8**, 261 (2018).
- [58] S. Provencher, *LCModel & LCMgui User's Manual* (PUBLISHER, 2020).